



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESÓRDENES DEL DESARROLLO SEXUAL:
MUTACIONES EN EL GEN *NR3C4* EN PACIENTES CON
SÍNDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ERIKA ALEJANDRA TREJO PÉREZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor:	Dr. FRANCISCO JAVIER PLASCENCIA DE LA PARRA
VOCAL	Profesor:	Dr. ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ
SECRETARIO	Profesor:	Dr. LUIS RAMOS TAVERA
1er. SUPLENTE	Profesor:	Dr. IGNACIO CAMACHO ARROYO
2do. SUPLENTE	Profesor:	Dra. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

ASESOR:

DR. LUIS RAMOS TAVERA

SUSTENTANTE:

ERIKA ALEJANDRA TREJO PÉREZ

RECONOCIMIENTO AL INCMNSZ



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal perteneciente al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Lucia y Jaime. Gracias por brindarme la oportunidad de crecer en todos los sentidos de mi vida y confiar siempre en mis decisiones. Por apoyarme y otorgarme todo su cariño en este largo y virtuoso recorrido, el cual ha sido producto de su admirable esfuerzo y sacrificio. No dimensionan lo fundamentales que son, estoy inmensamente agradecida. Con ustedes la vida tiene un propósito adicional. Los amo, incondicional e infinitamente.

A mis hermanos Elizabeth, David y Daniel. Gracias por formar parte de este proceso, de brindarme su cariño y su apoyo durante todo este camino. Sin duda, son parte fundamental en mi vida. Infinitas gracias por hacerme sentir idónea para enfrentar cualquier reto. Los amo en demasía.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por abrirme las puertas para realizar el presente trabajo.

Al Dr. Luis Ramos Tavera. Gracias por brindarme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por el enorme apoyo a la realización de este trabajo y brindarme las palabras necesarias en cada momento. Adicionalmente, quiero agradecerle todo el apoyo que recibí de usted a nivel personal, siempre estaré agradecida por estar al pendiente en los momentos complicados y ofrecerme su apoyo para resolverlos. Muchísimas gracias.

A los miembros del jurado por sus valiosas correcciones y comentarios al presente trabajo.

A mi colega y amiga Aidet. Gracias por brindarme tu confianza y apoyo incondicional durante toda mi estadía en el laboratorio y en la carrera. Siempre encontré en ti un lugar seguro, lleno de momentos agradables, risas, cariño y muchísima admiración. Siempre estarás presente. Te quiero mucho.

A mis amigas Loolvee, Alejandra, Vianey, Cristina, Bibiana y Nathaly. Ustedes representan el verdadero significado de la amistad. Gracias por el cariño colosal, los momentos llenos de alegría y su inmenso e incondicional apoyo durante toda mi formación. Siempre encontré en cada una, un lugar seguro y reconfortante. Son un pilar esencial en mi vida. Las amo y las admiro siempre.

A mis amigos Luis, Carlos y Alonso. Gracias por hacerme sentir escuchada y querida en todo momento. Por aquellas veces que me daban ánimos para continuar. Siempre estarán presente en este y todos los momentos. Los quiero infinitamente.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 Determinación y diferenciación sexual en mamíferos	11
2.2 Eje Hipotálamo-hipófisis-testículo	14
2.3 Esteroidogénesis	17
2.4 Receptor de andrógenos	20
2.4.1 Actividad del <i>AR</i> y mecanismo de acción	23
2.5 Desórdenes del Desarrollo Sexual (DSD)	25
2.5.1 Síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA)	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivos particulares	30
6. METODOLOGÍA	31
6.1 Pacientes	31
6.2 Extracción de DNA genómico	33
6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
6.4 Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP)	35
6.5 Purificación de DNA mediante electroelución	36
6.6 Secuenciación	37
7. RESULTADOS.....	38
8. DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIONES	51
10. PERSPECTIVAS	52
11. REFERENCIAS	53
ANEXO 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de cada exón del gen <i>NR3C4</i>	60

ABREVIATURAS GENERALES

17OHP	17-hidroxiprogesterona
17OHPreg	17 α -hidroxipregnenolona
17 β -HSD3	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 3
5 α -Red2	5 α -reductasa tipo 2
AMH	Hormona anti-Mülleriana
AR	Receptor de andrógenos
ARE	Elementos de respuesta a los andrógenos
CAG	Repeticiones de poliglutamina
CAH	Hiperplasia suprarrenal congénita
CAIS	Síndrome de insensibilidad a los andrógenos completo
CYB5	Citocromo b5
CYP450	Citocromo P450
CYP11A1 (P450scc)	Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol
DBD	Dominio de unión al DNA
ddH ₂ O	Agua bidestilada
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	5 α -dihidrotestosterona
DSD	Desorden del desarrollo sexual
Dyn	Dinorfina A
EMT	Transición epitelial a mesenquimal
ESPE	Sociedad Europea de Endocrinología Pediátrica
FDX1	Ferredoxina
FDXR	Ferredoxina reductasa
FSH	Hormona folículo estimulante
gDNA	DNA genómico
GGC	Repeticiones de poliglicina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HHT	Eje hipotálamo-hipófisis-testículo

HSD	Hidroxiesteroides deshidrogenasas
HSP	Proteínas de choque térmico
IGF-1R	Factor I de crecimiento similar a la insulina
IR3	Espaciador de 3 pares de bases
Kiss-1	Kisspeptina
LBD	Dominio de unión al ligando
LBP	" <i>Pocket</i> " de unión al ligando
LH	Hormona luteinizante
LWPES	Sociedad de Endocrinología Pediátrica Lawson Wilkins
MAIS	Síndrome de insensibilidad a los andrógenos leve
NKB	Neuroquinina B
NLS	Señal de localización nuclear
NTD	Dominio N-terminal
PAIS	Síndrome de insensibilidad a los andrógenos parcial
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína cinasa A
POA	Área preóptica medial
Preg	Pregnenolona
Prog	Progesterona
PSA	Antígeno prostático específico
RXFP2	Receptor de péptidos de la familia de la relaxina 2
SIA	Síndrome de insensibilidad a los andrógenos
SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
T	Testosterona
Tau	Unidades de activación transcripcional
TDF	Factor determinante del testículo
Tm	Temperatura de alineamiento
TMPRSS2	Proteasa transmembrana serina 2

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Nombre	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)
Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

ABREVIATURAS DE COMPUESTOS

DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Na ₂ EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético sódico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	TBE-EDTA

ABREVIATURAS DE GENES

<i>DHH</i>	<i>Desert hedgehog</i>
<i>DMRT1</i>	<i>Doublesex and mab-3 related transcription factor 1</i>
<i>FOXL2</i>	<i>Forkhead box protein L2</i>
<i>GATA-4</i>	<i>GATA binding protein 4</i>
<i>INSL3</i>	<i>Insulin-like peptide 3</i>
<i>LHX9</i>	<i>Lim homeobox gene 9</i>
<i>NR3C4</i>	<i>Nuclear Receptor subfamily 3 group C member 4</i>
<i>RSPO1</i>	<i>R-Spondin 1</i>
<i>SF-1</i>	<i>Steroidogenic Factor 1</i>
<i>SOX9</i>	<i>SRY-Box Transcription Factor 9</i>
<i>SRY</i>	<i>Sex determining Region of the Y chromosome</i>
<i>WNT4</i>	<i>Wnt Family Member 4</i>
<i>WT1</i>	<i>Wilms' tumor suppressor</i>

RESUMEN

La presencia de variantes génicas en aquellos genes participantes durante el desarrollo sexual en mamíferos conduce a la aparición de desórdenes del desarrollo sexual (DSD) donde el síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA) es el desorden más frecuente, predominantemente en pacientes con cariotipo 46,XY. La causa principal es la presencia de variantes genéticas a lo largo de los 8 exones que conforman al receptor de andrógenos (*AR/NR3C4*), donde la actividad residual del receptor determina el grado del desorden. En este estudio, dos pacientes con un cariotipo 46,XY fueron analizados para identificar variantes a lo largo del gen *NR3C4* mediante la amplificación individual de cada exón a partir de DNA genómico proveniente de muestras de sangre periférica de pacientes y controles que acudieron al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Con los productos amplificados obtenidos mediante PCR, se realizó el tamizaje molecular para identificar variantes génicas mediante polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) con subsecuente secuenciación para conocer la alteración en la secuencia nucleotídica presente en los pacientes. Los ensayos de SSCP detectaron una sustitución de un solo nucleótido en el dominio de unión al ligando (exón G) del gen *NR3C4* en el paciente 1 y su consanguíneo en la posición p.Arg847Lys del AR. Esta variante no se encuentra reportada a la fecha; sin embargo, podría asociarse a un fenotipo de resistencia androgénica parcial, cuyo resultado podría afectar la conformación del “*pocket*” de unión a ligando (LBP), sugiriendo la inactivación del receptor. Así mismo, la variante presente en ambos individuos, potencialmente puede ser producto de un proceso hereditario de la madre. Para el paciente 2, se detectó una delección de un solo nucleótido en el dominio de unión al DNA (exón C), en la posición p.Asn600Metfs*625. Esta variante ya ha sido reportada con anterioridad y se asocia a un diagnóstico de resistencia androgénica completo cuyo resultado son defectos en la actividad de unión y dimerización del DNA. Además, podría sugerir que el origen de la variante génica es *de novo*. Estudios a futuro sugieren realizar ensayos de funcionalidad del gen *NR3C4*. Este análisis genético/molecular es un aporte fundamental para el conocimiento de la etiología de la enfermedad y para el asesoramiento genético de los pacientes.

1. INTRODUCCIÓN

La determinación del sexo en mamíferos involucra 3 procesos consecutivos de señalización molecular: (1) el sexo cromosómico, que ocurre como consecuencia de la fertilización; (2) la determinación primaria del sexo, donde los factores genéticos impulsan el desarrollo y formación de testículo u ovario, y (3) la diferenciación sexual secundaria, definida como el desarrollo fenotípico sexual por la acción hormonal (Díaz, V., et al. 2017; Hou, L., et al. 2021). Si las células somáticas son XY, el gen *SRY* (*Sex determining Region of the Y chromosome*) se expresa para regular la vía de determinación masculina (Eggers, S., & Sinclair, A., 2012). En su ausencia, las crestas gonadales inducen la diferenciación ovárica adicional a la expresión de múltiples genes (Eggers, S., et al. 2014).

La presencia de variantes en genes involucrados en la determinación del sexo conduce a la aparición de desórdenes del desarrollo sexual (DSD), donde el sexo cromosómico, gonadal o anatómico es atípico (Hou, L., et al. 2021). Una de las causas principales es originada ya sea por la disminución en la producción de andrógenos como testosterona (T) o 5 α -dihidrotestosterona (DHT), o bien, a la alteración de la función del receptor de andrógenos (AR). Esta alteración genera resistencia hormonal o incapacidad de unión de T/DHT en tejidos blanco. Esta condición se conoce como síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA) y es una de las causas más comunes de los DSD, donde el cariotipo 46,XY es altamente frecuente en SIA (Wisniewski, B., et al. 2019).

Se estima que este desorden tiene una prevalencia de 1:20,000–1:100,000 nacimientos y se caracteriza por la presencia de gónadas testiculares en individuos con un fenotipo femenino completo o con diversos grados de virilización en genitales internos y externos. Por ello, el SIA se clasifica en tres categorías: SIA completo (CAIS), parcial (PAIS) y leve (MAIS), dependiendo de la severidad de resistencia androgénica por el AR (Tan, M., et al. 2015; Tyutyusheva, N., et al. 2021). La patología del desorden es el resultado de variantes a lo largo del gen *AR/NR3C4*; la mayoría de estas, son de origen germinal y en otros casos, se deben a variantes génicas somáticas o *de novo* durante la embriogénesis (Tyutyusheva, N., et al. 2021). El AR pertenece a la familia de receptores nucleares y está estructurado por un dominio N-terminal (NTD: exón A), un dominio de unión al DNA (DBD: exón B y C), una región bisagra y un dominio de unión al ligando (LBD: exón D-H) (Tan, M., et al. 2015).

Con el fin de colaborar a un diagnóstico correcto de la enfermedad y brindar una mejor calidad de vida en pacientes con un DSD 46,XY, la caracterización y búsqueda de variantes en el gen *NR3C4* representa una herramienta fundamental. Por lo que el presente trabajo busca brindar información, un diagnóstico molecular más certero y asesoramiento genético en 2 pacientes con DSD-46,XY con el fin de ofrecer un mejor enfoque molecular en el entendimiento de la etiología del síndrome.

2. ANTECEDENTES

2.1 Determinación y diferenciación sexual en mamíferos

En mamíferos, en la tercera o cuarta semana después de la concepción, las células germinales primordiales son las primeras células detectadas en el saco vitelino. Estas células migran y se diseminan en respuesta a señales quimiotácticas para dar origen a la formación de la cresta urogenital, estructura precursora de las gónadas (Díaz, V., et al. 2017). Posteriormente, la cresta urogenital se comienza a colonizar por los llamados precursores de células de soporte, progenitores esteroideogénicos y células germinales primordiales (Estermann, A., et al. 2020). Estos precursores se originan en el epitelio celómico subadyacente, que luego se someten a una transición epitelial a mesenquimal (EMT) donde expresan una única señal molecular que incluyen los factores de transcripción SF-1 (Steroidogenic Factor 1), GATA-4 (GATA binding protein 4), WT1 (Wilms' tumor suppressor 1) y LHX9 (Lim homeobox 9). Estos factores transcripcionales están principalmente asociados a la formación de cordones sexuales primitivos (Stévant, I., et al. 2018; Nef, S., et al. 2019).

Durante la formación de la cresta gonadal, el subconjunto de células que expresan el SF-1 dan lugar a la mayor parte de las células somáticas que componen la gónada bipotencial, incluidas las células de soporte y las células esteroideogénicas que se diferencian en células de Sertoli o en células de Leydig; respectivamente. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la diferenciación de estos linajes celulares está controlada primordialmente por la expresión del gen *WT1* (Zhang, L., et al. 2015; Stévant, I., et al. 2018; Estermann, A., et al. 2020). En ausencia de un cromosoma Y y la presencia de dos cromosomas X, las crestas genitales se desarrollan como ovarios debido a la expresión de factores de transcripción femeninos específicos tales como *RSPO1* (R-Spondin 1), *WNT4* (Wnt Family Member 4) y *FOXL2* (Forkhead box protein L2). Posteriormente, el ovario desarrollado induce la síntesis de estrógenos que contribuyen al desarrollo del útero, los oviductos y el cuello uterino a partir de los conductos de Müller (Hake, L., & O'Connor, C. 2008; Cools, M. et al. 2017).

La iniciación y el mantenimiento del sexo gonadal está determinado por interacciones antagónicas entre la vía ovárica y testicular. Si las células somáticas son XY, el factor determinante de testículo (TDF o *SRY*, *Sex determining Region of the Y chromosome*) se expresa en células pre-Sertoli alrededor de la sexta semana de gestación. Dicha expresión, se encarga de regular la vía de determinación del sexo masculino, en donde las gónadas fetales indiferenciadas se dirigen a una vía de diferenciación tisular que conduce a la formación de túbulos testiculares (Kojima, Y., et al. 2007; Eggers, S., & Sinclair, A. 2012).

La expresión del gen *SRY* desencadena eventos de señalización celular, que incluyen la migración de células metanéfricas a la gónada fetal. El *SRY* es un miembro de la familia de factores de transcripción y encargado de controlar la expresión de múltiples genes que participan en la diferenciación gonadal. Debido a su unión en regiones específicas del DNA, la proteína *SRY* tiene la habilidad de inducir la expresión de otras proteínas reguladoras como *SOX9* (*SRY-Box Transcription Factor 9*), *SF-1*, *DMRT1* (*Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*), *GATA-4* y *DHH* (*Desert hedgehog*). Uno de los principales factores de transcripción en el desarrollo testicular es el *SOX9*, un miembro de la familia de proteínas de unión al DNA del grupo de alta movilidad (*HMG*) que se encarga de inducir la diferenciación de las células de soporte a células de Sertoli dentro del testículo embrionario (Zhang, L., et al. 2015).

Alrededor de la sexta semana de gestación, las células de Sertoli diferenciadas producen la hormona antiMülleriana (*AMH*) gracias a la acción sinérgica de las proteínas reguladoras anteriormente mencionadas. La proteína *AMH* es responsable de inducir la regresión de los conductos Müllerianos en la gónada bipotencial durante la octava semana de gestación hasta la semana 12. Al mismo tiempo, durante la novena semana después de la concepción, el *SF1* induce la expresión de proteínas participantes en la vía esteroidogénica, con el fin de iniciar la biosíntesis de andrógenos en las células de Leydig, tales como la *T* necesaria para el desarrollo, diferenciación y crecimiento de los genitales internos como los conductos de Wolff, tales como el epidídimo, los conductos deferentes y vesículas seminales (Parker, K. 2002; Wilhelm, D., et al. 2007). Asimismo, la *T* sirve como sustrato para la síntesis de *DHT*, un esteroide 5α -reducido y necesario para el desarrollo completo de los genitales externos masculinos a través de la fusión de los pliegues genitales que forman el pene y el escroto, así como el desarrollo de la próstata (Wilhelm, D., et al. 2007; Donohue, P., 2020).

Una vez que maduran las gónadas masculinas, el descenso testicular es regulado por diferentes factores anatómicos y hormonales a través de dos etapas: (1) la fase transabdominal y (2) la fase inguinoescrotal. Ambas fases ocurren en humanos entre la décima y la decimoquinta semana de gestación; respectivamente (Mäkelä, J., et al. 2018; O'Neill, M., et al. 2019). La fase transabdominal del descenso testicular ocurre entre la décima y la décimo quinta semana de gestación y se basa en el desarrollo y la reorganización gubernacular bajo la influencia hormonal. El desarrollo del testículo ocurre en la superficie del mesonefros de la cresta urogenital, mientras que el *gubernaculum* se desarrolla a medida que el mesonefros retrocede al inicio de la diferenciación sexual. Una vez maduras las gónadas, que se encuentran ancladas inicialmente en la parte alta del abdomen y unidas al canal inguinal a través del *gubernaculum*, el descenso de los testículos se inicia por expansión gubernacular que ocurre en respuesta al ácido hialurónico y a los glucosaminoglicanos, promoviendo la retención de agua.

Posteriormente, ocurren procesos de división celular y generación de la matriz extracelular para que el *gubernaculum* aumente de tamaño (Hutson, M., et al. 2013; Lee, M., 2017).

Así mismo, el factor tipo insulina 3 (*INSL3*) producido en las células de Leydig, desempeña un papel central en el proceso de expansión gubernacular. Cuando la proteína INSL3 se acopla con el receptor peptídico RXFP2, se envían señales a las células gubernaculares para estimular su diferenciación y su crecimiento (Kumagai, K., et al. 2002; Lee, M., 2017). Después de completar la primera fase de descenso, hay una pausa en la migración testicular hasta la semana 25 en humanos donde tiene lugar la fase inguinoescrotal. Esta etapa depende principalmente de la acción de los andrógenos y consiste en el paso de los testículos desde el anillo inguinal interno hacia el escroto debido al acortamiento de la parte proximal del gubernaculum. Este mecanismo es causado por la desaparición de matriz extracelular y la condensación de material fibroso, provocando un incremento en la densidad celular (Lee, M., 2017).

Generalmente, la falta completa de actividad androgénica en fetos 46,XY con variaciones genéticas inactivantes del AR da como resultado el desarrollo de un fenotipo femenino y los testículos quedan ubicados en las regiones abdominales/inguinales. Las formas más leves dan como resultado una variedad de fenotipos que incluyen micropene, criptorquidia, escroto bífido y/o hipospadias (Hughes, I., et al. 2012).

2.2 Eje Hipotálamo-hipófisis-testículo

La reproducción, el desarrollo y el mantenimiento de las características sexuales masculinas son controladas principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT). El eje está compuesto biológicamente por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH) y los esteroides gonadales (Dhole, B., & Kumar, A., 2017).

Durante la ontogenia del eje HHT, las neuronas encargadas de secretar GnRH se desarrollan a partir del epitelio del área olfatoria medial y migran hasta el hipotálamo fetal. La glándula hipofisaria comienza la producción de gonadotropinas (FSH y LH) en la novena semana de gestación y alcanza su punto máximo en la semana 20, con una disminución gradual por el aumento progresivo de los esteroides placentarios; se ha observado que este mecanismo suprime la actividad del eje HHT fetal (Bizzarri, C., & Cappa, M., 2020). En la mitad de la etapa de gestación, FSH estimula la replicación de células de Sertoli con el fin de producir AMH e inhibina B. Por otro lado, la función de las células de Leydig durante la embriogénesis está modulada por la gonadotropina coriónica humana (hCG), que con el paso del desarrollo embrionario progresivamente es reemplazada por LH (Rey, R., & Grinspon, R., 2011).

La concentración en sangre de todas las hormonas involucradas en el eje testicular es baja al nacimiento e incrementan progresivamente en la primera semana de vida neonatal. Los niveles de las gonadotropinas, T y la proteína INSL3 son similares a los niveles hormonales en los adultos hasta el sexto mes de vida, cuando comienzan a descender a niveles bajos o indetectables. En esta etapa las células de Sertoli permanecen inmaduras hasta la pubertad (Kuiiri, T., et al. 2014) y es en esta etapa donde se inicia un aumento en la liberación pulsátil de GnRH desde el área preóptica medial (POA) hacia la hipófisis anterior. La generación del pulso también parece estar gobernada por un grupo de neuronas conocidas como KND, denominadas así por coexpresar kisspeptina, neuroquinina B (NKB) y dinorfina A (Dyn) en el núcleo arcuato del hipotálamo (Lehman, M., et al. 2010).

La hormona GnRH liberada, es transportada a través de la circulación portal, donde se une a receptores específicos de la superficie celular de la glándula hipofisaria anterior para inducir la liberación de las glicoproteínas LH y FSH. Las variaciones en las frecuencias y amplitudes del pulso de GnRH regulan la síntesis y liberación de FSH y LH en la hipófisis, donde las frecuencias de pulsos bajos (un pulso cada 2 h o más) estimulan una mayor producción de FSH y las frecuencias de pulsos altos (un pulso por hora) estimulan una mayor producción de LH, ambas liberándose a la circulación periférica (Dhole, B., & Kumar, A., 2017; Stamatiades, G., & Kaiser, U., 2018).

En varones, la LH estimula la producción de T a través de la unión con su receptor en las células de Leydig. Dicha unión, induce la activación de la vía cAMP (AMP cíclico) dependiente de PKA (*protein kinase A*) que induce la síntesis de enzimas necesarias para iniciar el proceso de esteroidogénesis testicular y producir T (Dhole, B., & Kumar, A., 2017). Por otro lado, la FSH se une a su receptor acoplado a proteína G específico en las células de Sertoli a través de un mecanismo dependiente de cAMP, estimulando el crecimiento testicular y la producción de varias proteínas de unión a andrógenos, los cuales son componentes del túbulo testicular necesarios para sustentar la maduración de los espermatozoides, tal como la inhibina B (Dhole, B., & Kumar, A., 2017). La T ejerce una retroalimentación negativa sobre las neuronas productoras GnRH y en las neuronas secretoras de kisspeptina en el núcleo arcuato, así como en la capacidad de respuesta en la hipófisis anterior a la GnRH (**figura 1**). Así mismo, también ejerce su efecto de retroalimentación negativa al estimular la liberación de péptidos opioides de las neuronas hipotalámicas, inhibiendo la secreción pulsátil de GnRH del hipotálamo. Por otro lado, la inhibina B también ejerce su efecto negativo sobre la glándula hipofisaria anterior, lo que suprime los niveles de FSH (Dhole B., & Kumar A. 2017; Stamatziades, G., & Kaiser, U., 2018).

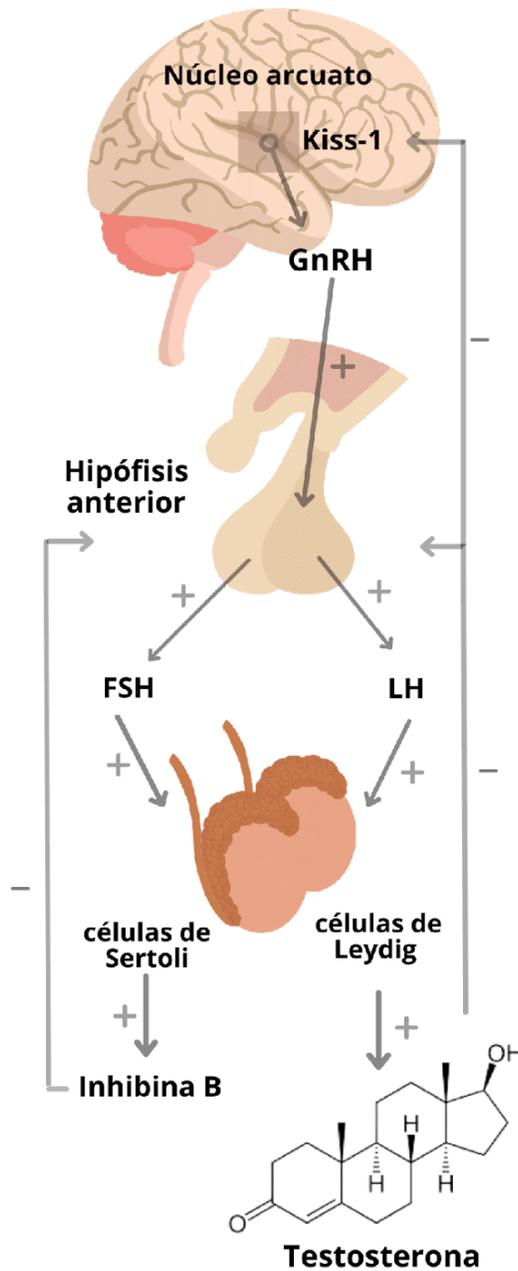


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La síntesis de GnRH es estimulada por neuronas secretoras de Kiss-1 ubicadas en el núcleo arcuato. GnRH se libera hacia la hipófisis anterior donde estimula la síntesis de hormonas gonadotrópicas: LH y FSH. Las células de Leydig ubicadas en los testículos responden a la estimulación por LH y secretan T. Las células de Sertoli estimuladas por FSH, liberan inhibina B. La T estimula negativamente a las neuronas del hipotálamo y a la glándula hipofisiaria. La inhibina B ejerce una retroalimentación negativa en la hipófisis para detener la síntesis de FSH.

2.3 Esteroidogénesis

Las hormonas esteroideas regulan una amplia variedad de procesos fisiológicos y del desarrollo durante la vida fetal y hasta la edad adulta. Todas ellas se sintetizan a partir del colesterol, por lo tanto; comparten una misma estructura química como se muestra en la **figura 2**. Dicha estructura se forma por 17 átomos de carbono conectados por la unión de 4 anillos, tres de ellos son ciclohexanos (A, B y C) y un anillo es un ciclopentano (D).

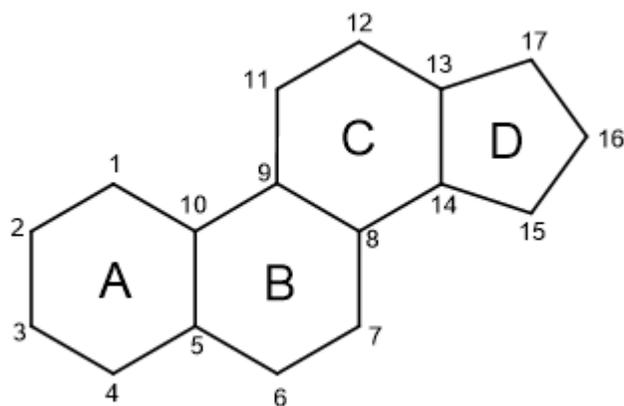


Figura 2. Estructura general de los esteroides. Estructura química formada por 17 átomos de carbono distribuidos en 4 anillos fusionados, los cuales 3 son ciclohexanos y 1 es un ciclopentano (ciclopentanoperhidrofenantreno).

Específicamente, el proceso biosintético donde el colesterol se convierte en hormonas esteroideas biológicamente activas se conoce como esteroidogénesis. Estas moléculas se sintetizan principalmente en la glándula suprarrenal y las gónadas bajo el control del eje regulador hipotálamo-hipófisis-glándula esteroidogénica (suprarrenal y gónadas) (Chakraborty, S., et al. 2021).

El proceso de esteroidogénesis involucra dos grupos enzimáticos principales: el citocromo P450 (CYP), que cataliza reacciones de hidroxilación y escisión de sustratos esteroideos mediante la ruptura de enlaces C-C; cuyas reacciones son irreversibles y por otro lado la participación de enzimas hidroxisteroides deshidrogenasas (HSD), involucradas en las reacciones de oxidación y reducción de hormonas. La mayoría de estas reacciones catalizadas por HSD son mecánicamente reversibles y pueden funcionar bidireccionalmente. Estas enzimas se encuentran en las membranas internas de la mitocondria y del retículo endoplásmico (Schiffer, L., et al. 2019; Milosevic, A., et al. 2021).

La molécula precursora de los esteroides hormonales, el colesterol, se puede obtener vía endógena a partir de acetato en el retículo endoplásmico y de forma exógena a partir de ésteres de colesterol

derivados de lipoproteínas y colesterol libre que reside en la membrana plasmática (Schiffer, L., et al. 2019).

La esteroidogénesis da inicio cuando las moléculas de colesterol son transportadas a la membrana interna de la mitocondria a través de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) donde ocurre la conversión de colesterol a pregnenolona (Preg) a través de tres reacciones de oxidación secuenciales: una 20 α -hidroxilación, 22-hidroxilación y la escisión de la cadena lateral del colesterol por el sistema conformado por CYP11A1 (P450_{scc}), ferredoxina (FDX1) y ferredoxina reductasa (FDXR) y cuya expresión se regula en respuesta a la estimulación de LH. Este es el primer paso limitante en la producción de T (Flück, C., et al. 2003).

La molécula de Preg resultante, se difunde pasivamente de la mitocondria al retículo endoplásmico liso donde se convierte a 17 α -hidroxipregnenolona (17OHPreg) y dehidroepiandrosterona (DHEA) mediante la vía Δ^5 . La primera reacción es catalizada por la actividad de la enzima CYP17A1 apoyada por la donación electrónica del cofactor oxidoreductasa P450 (POR). Mientras que la segunda reacción es catalizada por la actividad de la enzima CYP17A1 apoyada de POR y el citocromo b5 (CYB5) para facilitar una óptima conformación alostérica (Flück, C., et al. 2003; Auchus, R., 2004).

La DHEA es transformada gradualmente a T a través del intermediario androstendiol, reacción catalizada por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 3 (HSD17B3/17 β -HSD3). La T puede ser reducida a DHT a través de la actividad de la 5 α -reductasa tipo 2 (SRD5A2/5 α -Red2), enzima expresada principalmente en la piel genital y la próstata. La DHT presenta mayor afinidad por el receptor de andrógenos (AR/NR3C4) que la T debido a que el tiempo de disociación entre DHT-AR es mayor (Flück, C., et al. 2003). La vía esteroidogénica predominante en humanos está representada en la **figura 3**.

En humanos, sólo una pequeña fracción de pregnenolona se convierte a androstendiona mediante la vía Δ^4 , cuyo intermediario es la progesterona (Prog) y la 17-hidroxiprogesterona (17OHP). La baja eficiencia de esta conversión se debe a que la actividad de la enzima 17,20 liasa es pobre teniendo como sustrato a 17OHP en comparación con la 17OHPreg y porque su actividad es menos abundante en humanos (Flück, C., et al. 2003).

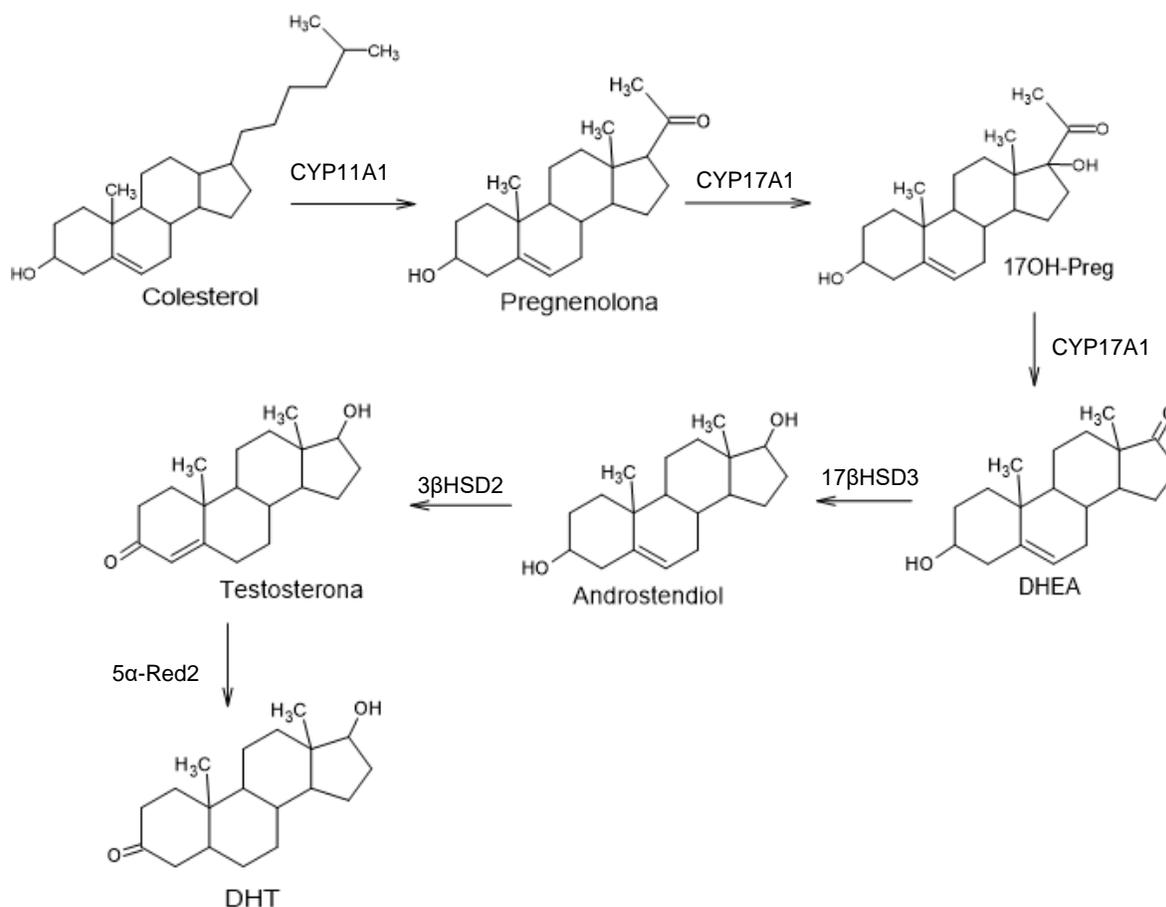


Figura 3. Biosíntesis de andrógenos vía Δ^5 en los testículos. Las células de Leydig producen esteroides C_{19} a través de la vía clásica Δ^5 que predomina en humanos. El colesterol es transportado a la membrana interna de la mitocondria donde la cadena lateral se escinde y forma la Preg por acción de la enzima CYP11A1. La Preg se convierte a 17OH-Preg y posteriormente a DHEA por acción de la enzima CYP17A1, ambas apoyadas por la oxidorreductasa P450 y el citocromo b5. DHEA es convertida a androstendiol, intermediario de la T gracias a la acción de 17 β HSD3 y posterior participación de la 3 β HSD2. Finalmente, la T se reduce a DHT por acción de la enzima 5 α reductasa 2, considerado el andrógeno más potente.

En años recientes se ha identificado una vía alternativa para la producción de DHT denominada *backdoor* que diverge de precursores comunes de la vía clásica, pero sin emplear a T como intermediario. En esta vía de síntesis, los precursores C_{21} , principalmente la Prog y la 17OHP, son sustratos de reductasas y aquellas pertenecientes a la familia HSD para la obtención final de DHT. Así mismo, las células de Leydig también pueden producir estrógenos a través de la enzima microsomal CYP19A1, responsable de catalizar la aromatización de T a estradiol. Los estrógenos derivados de andrógenos contribuyen a numerosos procesos fisiológicos, incluida la maduración esquelética (Flück, C., et al. 2003; Auchus, R., 2004; Mares, L., et al. 2020).

2.4 Receptor de andrógenos

El AR pertenece al grupo de receptores nucleares y es un factor de transcripción dependiente del ligando, responsable de regular la expresión de genes involucrados en la diferenciación sexual, el desarrollo y la expresión del fenotipo masculino a través de la unión del complejo andrógeno-AR a una secuencia específica del DNA. El gen responsable que lo codifica es denominado *NR3C4* (receptor nuclear subfamilia 3, grupo C, gen 4) y se localiza en el cromosoma X, específicamente en la región q11–q12 (Gelmann, E., 2002).

La región codificante de la proteína contiene 2757 pares de bases que abarcan un total de ocho exones. La proteína está formada por 919 aminoácidos y tiene un peso molecular de 110 kDa. El AR/NR3C4, como todos los receptores esteroides, se compone de 3 regiones principales: (i) un dominio N-terminal (NTD) (residuos 1–555) codificado en su totalidad por el exón A, seguido de (ii) un dominio de unión al DNA (DBD) (residuos 555–623) encargado de unir al receptor a secuencias específicas del DNA y codificado por los exones B y C; y (iii) un dominio de unión al ligando C-terminal (LBD) (residuos 665–919) que se encuentra unido a una región bisagra (residuos 623–665) codificado por los exones D al H (**figura 4**). Los tres dominios que conforman al AR/NR3C4 son importantes para su función (Gelmann, E., 2002; McEwan, I., 2004).

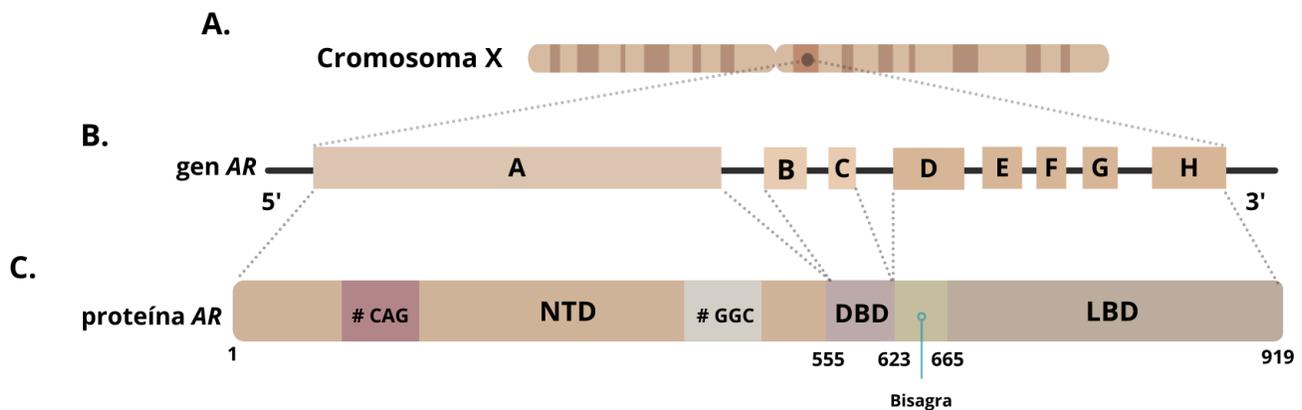


Figura 4. Ubicación génica y estructura del AR/NR3C4. **A.** El gen *NR3C4* se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma X. **B.** El gen está constituido por ocho exones identificados cada uno por una letra en dirección 5'-3'. **C.** La proteína resultante se divide en tres dominios funcionales: (i) un dominio N-terminal (NTD), (ii) un dominio de unión de DNA (DBD), (iii) un dominio de unión al ligando C-terminal (LBD) unido a una región bisagra.

El primer exón codifica en su totalidad para la región NTD y contiene una secuencia de extensión variable de poliglutaminas (CAG) y poliglicinas (GGC). La repetición de triplete CAG comienza a partir del codón 58 y se extiende de 11–31 repeticiones en hombres sanos. Numerosos estudios epidemiológicos han determinado que la prolongación de repeticiones (CAG)_n se asocian con trastornos relacionados a la reducción de la actividad de los andrógenos (Gelman E., 2002; Mouritsen, A., et al. 2013). En el caso de las repeticiones GGC, la longitud se extiende de 22–24 repeticiones de glicinas. Por lo tanto, alelos de repeticiones de bajo tamaño CAG (<19 repeticiones) y GGC (<15 repeticiones) resulta en una alta actividad del AR/NR3C4 (Esteban, E., et al. 2005).

Dentro del dominio NTD se encuentra una región de actividad transcripcional conocida como función de activación 1 (AF1). Esta región contiene dos unidades de activación transcripcional (Tau) separadas: Tau-1 y Tau-5. Estas regiones son indispensables para la actividad funcional completa del AR/NR3C4. A nivel de proteína, la región Tau-1 y Tau-5 contienen un motivo de 5 aminoácidos cada una (²³FQNLF²⁷ y ⁴³³WHTLF⁴³⁷) respectivamente, donde se ha observado que estas regiones regulan las interacciones directas entre los dominios NTD y LBD (denominada interacción N/C), que son importantes en la regulación de algunos genes dependientes de andrógenos. La interacción N/C también ayuda a estabilizar el dímero del AR/NR3C4 y a disminuir la velocidad de disociación del ligando (He, B., et al. 2000; McEwan, I., 2004; Callewaert, L., et al. 2006).

Los exones B y C codifican para la región DBD, cuyo dominio es importante para la dimerización del AR/NR3C4 y para la unión al DNA. Esta región es rica en cisteínas y es altamente conservada entre los receptores esteroides, ya que se conforma por un núcleo compuesto por dos dedos de zinc (Zn). La activación específica y selectividad del AR/NR3C4 se logra mediante la dimerización del receptor en una forma “cabeza a cabeza” y su posterior unión al promotor de los elementos de respuesta selectiva a los andrógenos (ARE) del DNA, los cuales son secuencias de dos semisitios hexaméricos (por ejemplo, 5'-AGAACA-3') separados por un espaciador de 3 pares de bases (IR3) (Schoenmakers E., et al. 2000; Verrijdt, G., et al. 2000; Shaffer, L., et al. 2004). La hélice α del primer dedo de Zn (hélice de reconocimiento) interactúa directamente con los nucleótidos en el elemento de respuesta ubicados en el surco principal del DNA a través de la región denominada caja P (proximal). Mientras que el segundo dedo de Zn contiene una región conocida como caja D (distal), que funciona como interfaz en la dimerización del AR/NR3C4 y su unión a los ARE (Beato, M., et al. 1995; McEwan, I., 2004).

Los exones D al H codifican para la región bisagra y la región LBD. Esta última región se caracteriza por una estructura de 12 hélices que se pliegan para formar un “*pocket*” de unión al ligando (LBP). La estructura forma el núcleo del dominio de la función de activación 2 (AF2) y actúa como una “tapa” para cerrar el LBP tras la unión de T o DHT. La región AF2 también es relevante en la unión de moléculas

coactivadoras al ser un sitio de acoplamiento para motivos LxxLL presente en dichas proteínas. Además, AF2 participa en la interacción con la región NTD del AR/NR3C4 de forma intramolecular para la formación de la interacción N/C (Hur, E., et al. 2004; Tan, M., et al. 2015).

2.4.1 Actividad del AR y mecanismo de acción

La expresión del AR/NR3C4 ha sido identificada en numerosos tejidos, tales como los testículos, la próstata, la hipófisis, el hipotálamo y el hígado (Raudrant, D., & Rabe, T., 2003). En ausencia del ligando, el AR/NR3C4 es localizado en el citoplasma como parte de un complejo de proteínas de choque térmico (HSP) y chaperonas, con el fin de coadyuvar a mantener el estado inactivo del AR/NR3C4 y evitar un estado competente para su unión a ligandos (Ozanne, D., et al. 2000, Tan, M., et al. 2015).

Después de la síntesis de T por las células de Leydig, el esteroide es transportado por sangre a los tejidos blanco a través de la unión con proteínas como la albúmina y la β -globulina. Debido a su carácter lipofílico, la T se disocia de las proteínas séricas y difunde pasivamente por la membrana citoplasmática. Dentro de la célula, una fracción de T se convierte a DHT por acción de la 5α -Red 2, donde ambos ligandos inducen un cambio conformacional cuando se unen al AR/NR3C4, provocando que éste se disocie de las HSP y exponga una señal de localización nuclear (NLS). Con el fin de translocar el complejo AR/NR3C4-ligando al núcleo, diversas redes de transporte celular se activan una vez que la importina- α se une a NLS. Se ha reportado que esta región representa el sitio principal de unión a moléculas coactivadoras (Ni, L., et al. 2013; McEwan, I., & Smith, L., 2018).

La unión de T y DHT permiten la dimerización del receptor a través de la interacción N/C terminal donde la región AR-LBD sufre un reordenamiento conformacional exponiendo la región AF2 en la superficie para su unión con moléculas coactivadoras. Este dominio interactúa preferentemente con el dominio AF1 contenido en la región NTD del AR/NR3C4, formando enlaces intermoleculares para que, posteriormente, el dímero se dirija al núcleo y se una a los ARE de diversos genes blanco para modular su transcripción génica (**figura 5**). Los genes blanco para AR/NR3C4 son el receptor del factor de crecimiento tipo I similar a la insulina (IGF-1R), el antígeno prostático específico (PSA) y la proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2) (Känsäkoski, J., et al. 2016).

La actividad transcripcional del AR/NR3C4 unido a andrógenos es regulada por proteínas específicas conocidas como moléculas correguladoras, cuya capacidad es inducir o reprimir la expresión génica a través de procesos como remodelación de la cromatina y las modificaciones de histonas, además de participar en el reclutamiento de la maquinaria transcripcional (Davey, R., & Grossmann, M., 2016).

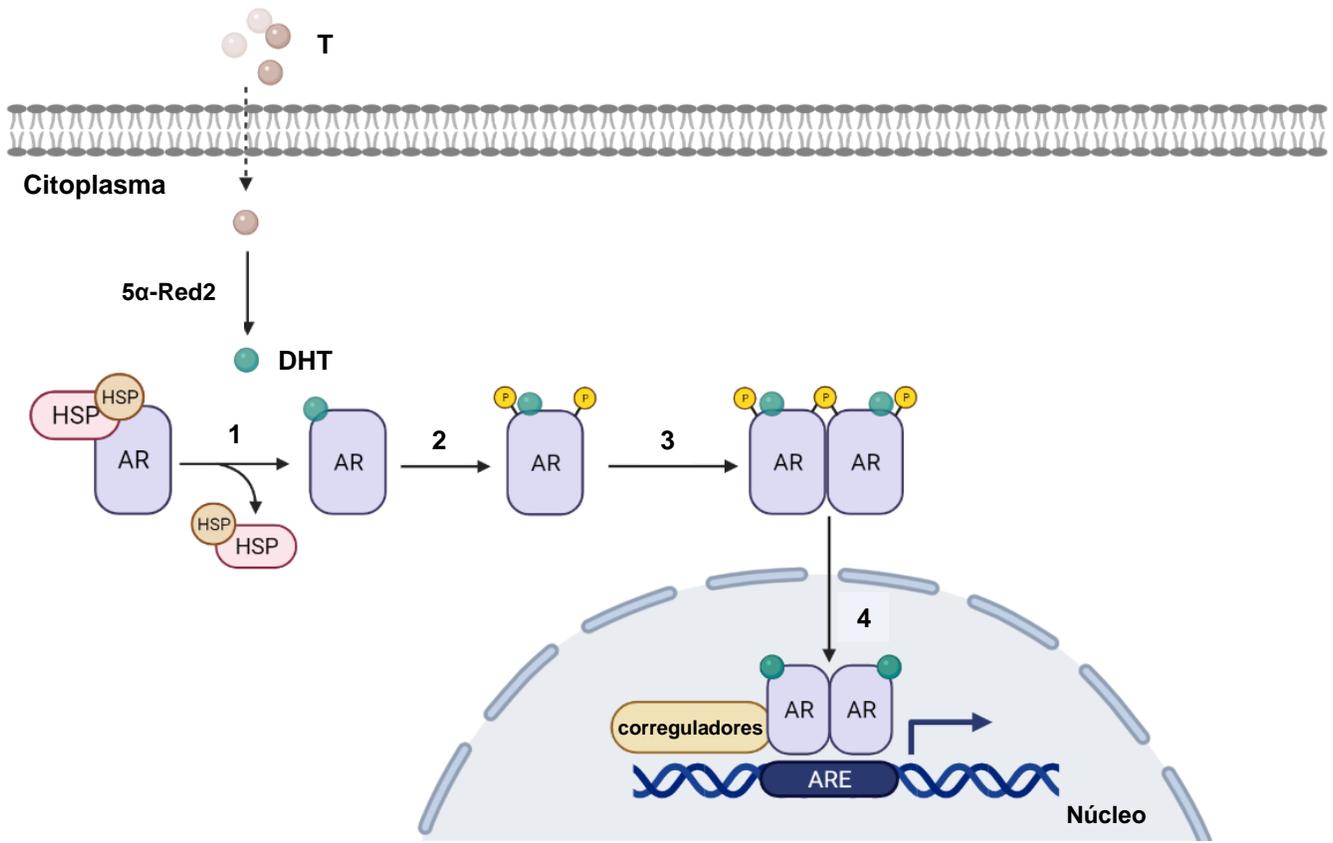


Figura 5. Mecanismo molecular de activación del AR/NR3C4. El AR/NR3C4 reside en el citoplasma como parte de un complejo de unión con proteínas de choque térmico (HSP). La T recién sintetizada, difunde al interior de la célula donde se convierte en su ligando más potente, la DHT, por acción de la enzima microsomal 5 α -Red 2. **1.** Una vez que DHT se une al AR/NR3C4, se induce un cambio conformacional que conlleva a la disociación del complejo AR-HSP. **2.** El AR/NR3C4 disociado de las HSP es susceptible a modificaciones postraduccionales con el fin de regular la función del AR/NR3C4 e interactuar con otras vías de señalización. **3.** Posteriormente, como parte del proceso de activación del AR/NR3C4, el receptor se dimeriza y se transloca al núcleo. **4.** El dímero reconoce los ARE en la región promotora de diversos genes diana, como el PSA y TMPRSS2. En el promotor, el AR/NR3C4 es capaz de reclutar miembros de la maquinaria de transcripción basal, corre reguladores como las moléculas de coactivación p160, entre otros.

2.5 Desórdenes del Desarrollo Sexual (DSD)

Los DSD son anomalías congénitas en donde existe una discordancia entre el sexo cromosómico, genético o gonadal y el fenotipo sexual. La mayoría de los DSD afectan la acción hormonal durante la embriogénesis, lo que resulta en una amplia variedad de fenotipos clínicos y hormonales de individuos que padecen esta patología (Grinspon, P., et al. 2020). Los pacientes pueden ser identificados al nacimiento debido a la presencia de genitales ambiguos. Sin embargo, algunos pacientes pueden presentar virilización posnatal, pubertad retrasada o ausente e incluso infertilidad (Hughes, A., et al. 2007). Por ello, en el 2015 la Sociedad de Endocrinología Pediátrica Lawson Wilkins (LWPES, por sus siglas en inglés) y la Sociedad Europea de Endocrinología Pediátrica (ESPE, por sus siglas en inglés) han propuesto clasificar a estos desórdenes en función a los cromosomas sexuales presentes en el cariotipo del paciente, por lo que se dividen en tres grandes grupos: DSD cromosómico, DSD con cariotipo 46,XY y DSD con cariotipo 46,XX.

2.2.1 DSD cromosómico.

Estos DSD incluyen cualquier condición en donde el número de cromosomas sexuales presentes en el individuo esté alterado. Dentro de este grupo de cromosomopatías, se incluyen individuos con cariotipo: 47,XXY conocido como síndrome de Klinefelter y sus variaciones, individuos 45,X cuya afección se conoce como síndrome de Turner y sus variaciones, pacientes 45,X/46,XY que presentan disgenesia gonadal mixta e individuos 46,XX/46,XY con quimerismo (Ahmed, F., et al. 2015).

2.2.2 DSD 46,XX

En pacientes con DSD 46,XX se abarcan las alteraciones del desarrollo sexual, como la disgenesia gonadal y los desórdenes secundarios debidas al exceso de andrógenos. Este exceso durante el embarazo puede ser endógeno o exógeno. La causa genética más común de su aparición es la hiperplasia suprarrenal congénita (CAH) debido a la deficiencia de la enzima 21 α -hidroxilasa (Ahmed, F., et al. 2015).

2.2.3 DSD 46,XY

En general, este grupo de pacientes se puede dividir en dos categorías; aquellos desórdenes presentes en el desarrollo testicular (gonadal) caracterizados por ausencia o presencia de testículos pequeños y la existencia de estructuras Mülllerianas con grados variables de feminización en genitales externos, así como niveles bajos en sangre de T y androstendiona; y aquellos desórdenes originados en la síntesis de andrógenos y la alteración de la acción de la T, lo cual conduce a la feminización de los

genitales externos (Wherrett, D., 2015). Sin embargo, las causas más comunes en pacientes 46,XY con un DSD son la deficiencia de 5 α -reductasa 2 (Ramos, L., et al., 2020) y el síndrome de insensibilidad a los andrógenos o SIA donde el AR/NR3C4 no se activa debido a la incapacidad de unión de la T o la DHT al receptor (Mongan, N., et al., 2015; Ramos, L., et al., 2018).

2.5.1 Síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA)

El síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA) es una condición que se caracteriza por la ambigüedad de genitales externos al nacimiento, desarrollo sexual secundario anormal en la pubertad e infertilidad en individuos con un cariotipo 46,XY. Es una enfermedad de carácter recesivo ligada al cromosoma X cuyo resultado es la disfunción del AR/NR3C4 por consecuencia de diversos cambios en la secuencia presentes en el gen *NR3C4* que lo codifica, lo que provoca una resistencia total o parcial a las acciones biológicas de los andrógenos (Adachi, M., et al. 2000; Melo, K., et al. 2005).

El fenotipo con SIA depende del grado de actividad del AR/NR3C4 resultando en tres fenotipos característicos: CAIS, donde el individuo presenta genitales externos completamente femeninos y la actividad residual del AR/NR3C4 es mínima o está ausente, PAIS con un grado variable de ambigüedad genital externa debido a una respuesta parcial a los andrógenos y MAIS cuyos individuos se caracterizan por presentar fenotipo masculino asociado a infertilidad y ginecomastia (Werner, R., et al., 2012).

Actualmente, suman más de 800 variantes reportadas a lo largo del gen *AR/NR3C4* relacionadas con aspectos clínicos del SIA. Cerca del 30% de las variantes encontradas en el gen *NR3C4* causantes del SIA, son de *novo* y sin sentido ubicadas principalmente a lo largo de la región LBD de la proteína, que pueden resultar en un fenotipo CAIS o PAIS dependiendo del grado de disfunción del receptor (Gottlieb, B., 2012; Jääskeläinen, J., 2012; Werner, R., et al., 2012). Sin embargo, también se han identificado variantes con cambio en el marco de lectura (deleciones o inserciones) y variantes intrónicas que alteran el sitio de empalme (Werner, R., et al., 2012).

Alrededor del 80–100% de los pacientes diagnosticados con CAIS, presentan una variante en el AR/NR3C4. A pesar de que no se han identificado variantes génicas en el receptor para todos los pacientes diagnosticados con resistencia androgénica completa, se ha planteado la posibilidad de que existan cambios en la secuencia nucleotídica de cofactores necesarios para la actividad del receptor; sin embargo, tales variantes son poco frecuentes (Känsäkoski, J., et al, 2016).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la incidencia de SIA varía enormemente a nivel global y junto con la poca información reportada de pacientes en México (Vilchis, et al., 2003; Ramos, L., et al., 2018), este estudio es de utilidad clínica y genética para conocer la presencia e influencia de variantes genéticas a lo largo del AR/NR3C4 y con ello entender la etiología de la enfermedad y dar seguimiento a pacientes enfermos en población mexicana ya que, como se ha mencionado con anterioridad, las variantes presentes en el AR/NR3C4 son la causa principal de SIA y dado su patrón de herencia recesivo ligado a X, este representa un factor de riesgo para la descendencia de mujeres portadoras. La identificación del tipo de variante génica presente, su localización en el gen y sus posibles implicaciones es un aporte al conocimiento de la enfermedad, ya que puede tratarse de variantes no reportadas en las bases de datos disponibles en la literatura, lo que facilita la búsqueda y la prevalencia de las alteraciones descritas a la fecha.

El diagnóstico y seguimiento del SIA requiere del enfoque de un equipo multidisciplinario, incluyendo especialistas en diversas áreas sociales, por lo que los resultados de estos estudios apoyan el posible tratamiento de pacientes mexicanos con el fin de mejorar su calidad de vida sexual, promoviendo su beneficio físico, mental y social. Así mismo, se busca fomentar el conocimiento y divulgación para la creación de redes de apoyo a favor de la asesoría genética de pacientes con SIA. Con ello, es necesario sensibilizar a los familiares del paciente haciendo énfasis en los riesgos, beneficios y desenlaces potenciales del tratamiento, así ellos participarán de forma más activa para el cuidado del paciente.

4. HIPÓTESIS

Si el AR es un factor determinante en la diferenciación sexual, se espera identificar y determinar variantes genéticas en la región codificante del gen *AR/NR3C4* en pacientes con cariotipo 46,XY con DSD.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar y determinar variantes en el gen *AR/NR3C4* en dos pacientes diagnosticados con DSD 46,XY y correlacionar las variantes encontradas con las reportadas en la literatura.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar los parámetros óptimos de amplificación para cada uno de los exones del gen *NR3C4*.
- Identificar variantes en la región codificante del gen *NR3C4* mediante tamizaje molecular.
- Determinar y secuenciar el tipo de variante génica previamente identificada y correlacionar los resultados con las reportadas en la literatura.

6. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal del Departamento de Biología de la Reproducción en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán bajo la tutela del Dr. Luis Ramos Tavera. Este estudio observacional fue aprobado por el Comité Ético Institucional de Investigación en Humanos perteneciente al Instituto (BRE-2614-18-21-1).

En el siguiente apartado, se describe la metodología realizada para los fines del presente escrito.

6.1 Pacientes

El primer individuo (11) de origen mexicano con 28 años presenta un cariotipo 46,XY con ambigüedad genital, donde se distingue la presencia de micropene, ausencia de vello axilar y púbico, ginecomastia bilateral y testículos criptorquídicos en posición supraescrotal, y cuya asignación del sexo al nacimiento fue masculina. Los perfiles hormonales indicaron niveles de gonadotropinas de LH < 0.1 ng/dL, FSH 0.15 ng/dL y de T = 0.12 ng/dL, respectivamente. Debido a que el SIA es una enfermedad de carácter hereditario, se requirió del análisis y obtención de gDNA de familiares cercanos al paciente (1–14). El árbol genealógico obtenido se muestra en la **figura 6**, donde se analizaron también, a aquellos individuos señalados con una flecha.

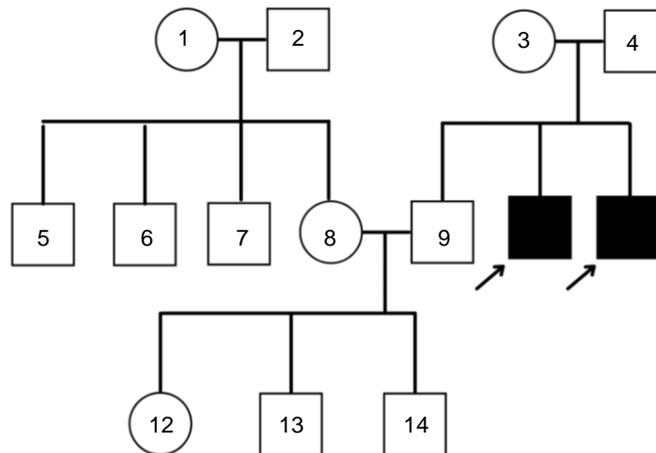


Figura 6. Árbol genealógico de la familia del paciente 1 con un DSD 46,XY. Las flechas indican aquellos miembros consanguíneos del paciente donde se obtuvo gDNA para el análisis de variantes en el gen *NR3C4*.

El segundo individuo (12) de origen mexicano con 24 años presenta un cariotipo 46,XY. El fenotipo del paciente es completamente femenino, con presencia de amenorrea primaria, escaso o ausente vello axilar y púbico, completo desarrollo mamario (Tanner V) y ausencia de próstata. La ultrasonografía mostro la ausencia de útero, cérvix y genitales internos femeninos. Para este paciente, no se obtuvieron valores de FSH y LH. En la **figura 7**, se muestran los individuos consanguíneos (1–17) del paciente que participaron en este estudio.

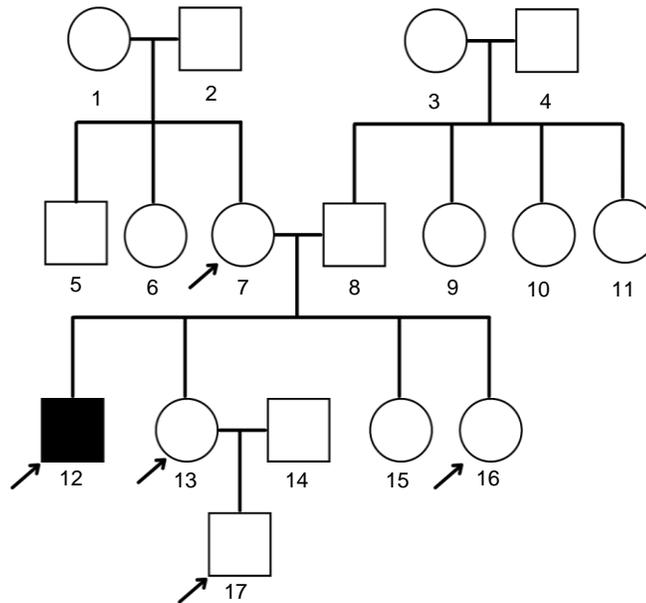


Figura 7. Árbol genealógico de la familia del paciente 2 con un DSD 46,XY. Las flechas indican aquellos miembros consanguíneos del paciente donde se obtuvo gDNA para el análisis de variantes en el gen *NR3C4*.

6.2 Extracción de DNA genómico

El aislamiento de DNA genómico (gDNA) de los pacientes mexicanos se realizó en el año 2021. Las muestras de pacientes y controles se obtuvieron a partir de 10 mL de sangre periférica en tubos con EDTA. Posteriormente, el volumen se transfirió a tubos cónicos estériles de 50 mL, se añadieron 200 μ L de EDTA 0.5 M y se mezclaron por inversión colocándolos en hielo, donde se le adicionó a cada tubo, una solución fría de sacarosa tritón 2X (sacarosa 0.64 M, tris-base 0.02 M, $MgCl_2$ 0.01 M, tritón X100 2 %) hasta obtener un volumen final de 35 mL.

Los tubos se llevaron a un volumen de 50 mL con agua estéril desionizada y destilada (ddH_2O) donde se colocaron en hielo 10 min, mezclándolos varias veces por inversión. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1000 xg durante 15 min a 4°C, donde el sobrenadante se decantó y el precipitado celular se conservó y fue sometido a un proceso de lavado con 5 mL de sacarosa tritón 1X con posterior centrifugación bajo las mismas condiciones. El precipitado celular obtenido, se resuspendió en 3 mL de solución de Lisis Nuclear (tris-base 10 mM, NaCl 400 mM, Na_2EDTA 2 mM), 108 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20 % y 100 μ L de proteinasa K (5 mg/ml) donde se incubó durante 2 h a 50°C con agitación constante (Boekel Industries INC. Incubator Shaker II).

El volumen resultante se transfirió a tubos cónicos estériles de 15 mL. Se adicionó 1 mL de NaCl saturado a cada tubo. Los tubos se agitaron vigorosamente 15 s y se centrifugaron a 1000 xg durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a tubos cónicos estériles de 15 mL en donde se le adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío. El contenido resultante se mezcló por inversión hasta observar la precipitación del DNA, se extrajo con una pipeta Pasteur, se sometió a un proceso de lavado con etanol al 70 % aproximadamente 30 s y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 s.

El DNA adherido a la pipeta Pasteur, se introdujo a un tubo para microcentrífuga que contenía 400 μ L de Tris-EDTA (TE, 1 mL tris 1 M, 0.02 ml de EDTA 0.5 M) y se agitó suavemente para favorecer el desprendimiento y la resuspensión del material genético. Los tubos fueron colocados toda la noche a 37°C ([*Bellco Glass, Inc. Incubator ESCU-BR-003 Biotechnology NY USA, Cell-Production Roller Apparatus*]).

El DNA se cuantificó y se verificó su pureza espectroscópicamente (*Beckman DU° 650 Spectrophotometer*). La concentración final para cada muestra biológica se estableció a 350 ng/ μ L.

6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los 8 exones que conforman el gen *NR3C4* se realizó de manera individual mediante PCR. Los oligonucleótidos se diseñaron específicamente para cada exón a través de secuencias nucleotídicas en la base de datos NCBI utilizando el programa de diseño *PrimerQuest* encontradas en el anexo A.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la adición de los siguientes reactivos: 5 μL de solución amortiguadora 5X (Promega), 0.5 μL de dNTPs (10 μM), 0.5 μL del oligonucleótido 5' (20 μM), 0.5 μL del oligonucleótido 3' (20 μM) previamente diseñados, 0.1 μL de DNA Taq polimerasa (*GoTaq Flexi DNA polymerase* 5 u/ μL , Promega), 1 μL de DMSO (1%), 0.1 μL de dCTP ($\alpha\text{-}^{32}\text{P}$), 1.5 μL de gDNA de controles y pacientes, 1.5, 2.0 y 2.5 μM de MgCl_2 y la reacción fue llevada a un volumen final de 20 μL con ddH₂O. El proceso de amplificación de cada exón en muestras de pacientes y controles se realizó como se representa en la **tabla 1**, donde las muestras se sometieron a un proceso de desnaturalización inicial con un ciclo de 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, con posterior temperatura de alineamiento (T_m) entre 57°C–68°C (dependiendo del exón) durante 30 s y una fase de extensión a 72°C un lapso de 30 s. Finalmente, el proceso de extensión final se realizó con un ciclo a 72°C por 3 min en el termociclador (*Applied Biosystems, Verti Thermal Cycler*).

Tabla 1. Condiciones de amplificación de cada fragmento por PCR

No. ciclos	T ₁	T ₂	T ₃
1	94°C / 3 min		
30	94°C / 30 s	58-67°C / 40 s	72°C / 30 s
1			72°C / 3 min

Una vez terminada la reacción de PCR, los productos amplificados se sometieron a un proceso de electroforesis en geles de agarosa al 1% [1.2 g de agarosa en 120 mL de TBE 0.5X (TBE 5X, 27.5 g de H₃BO₃, 54 g de tris base, 20 ml de EDTA 0.5 M)] teñido con 0.7 μL de bromuro de etidio donde, para cada reacción, se utilizaron 5 μL del producto amplificado con 3 μL de solución de carga empleando un marcador de peso molecular de 100 pares de bases. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 50 min, y los productos obtenidos se visualizaron en el fotodocumentador *ChemIDoc XRS+ Molecular Imagen, BIO-RAD* en el programa *Image Lab*.

6.4 Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP)

Una vez amplificados los exones del gen *NR3C4* de los pacientes y controles, se realizó la detección de variantes genómicas mediante diferencias de movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (30 x 40 cm) bajo las siguientes condiciones: 5.4% sin glicerol [42.91 mL de ddH₂O, 14.0 mL de TBE 5X, 12.6 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de persulfato de amonio al 10%], 5.4% con glicerol [35.91 mL de ddH₂O, 7.0 mL de glicerol, 14.0 mL de TBE 5X, 12.6 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de persulfato de amonio al 10%], 8.0% sin glicerol [36.89 mL de ddH₂O, 14 mL de TBE 5X, 18.66 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de persulfato de amonio al 10%] y 8.0% con glicerol [29.85 mL de ddH₂O, 14 mL de TBE 5X, 18.66 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de persulfato de amonio al 10%].

Las soluciones fueron desgasificadas durante 5 min utilizando un sistema de vacío y con agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo, se adicionó un volumen de 25 µL de tetrametiletilendiamina (TEMED) para cada sistema y el gel se dejó polimerizar durante 1 h. Los sistemas se colocaron en cámaras electroforéticas con 1.0 L de solución de TBE 0.5X en donde fueron añadidos en cada pozo 1.5 µL de una solución preparada con 2 µL del producto amplificado por PCR y 13 µL de solución amortiguadora para SSCP (formamida 95%, EDTA 20 mM y azul de bromofenol 0.05 %). Las muestras fueron previamente desnaturalizadas a 94°C durante 5 min y colocadas inmediatamente en hielo. La separación electroforética se realizó a 250 V y 200 V (con o sin contenido de glicerol, respectivamente) durante 18–20 h.

Para la detección de la radioactividad emitida por el isótopo α -³²P se empleó un detector tipo Geiger-Müller, donde el fragmento del gel de interés se colocó en un papel Whatman 3MM (22 cm largo x 18 cm de ancho) y se sometió a un proceso de desecación [SAVANT *Slab Gel Dryer* SGD4050] a 70°C durante 1 h. Posteriormente, las muestras transferidas al papel se expusieron a una placa *Molecular Imager FXTM*, *Imaging screen-K BIO-RAD* durante 3 h.

Finalmente, las muestras transferidas a la pantalla se analizaron en un escáner PMI (*Personal Molecular Imager BIO-RAD*) mediante el programa *QuantityOne*.

6.5 Purificación de DNA mediante electroelución

Los productos de PCR con alteración en la movilidad electroforética fueron purificados mediante electroelución. El proceso de purificación comenzó mediante la realización de un PCR para cada exón bajo condiciones previamente estandarizadas. Se obtuvo un volumen final de 100 μ L del producto, en los cuales se añadieron 20 μ L de solución de carga, se mezclaron cuidadosamente y se colocaron en un gel de agarosa al 1.0% (1.2 g de agarosa y 120 mL de TBE 0.5X) donde se dejaron migrar electroforéticamente a 100 V durante 1 h. El gel resultante se visualizó en un transiluminador de rayos UV (UV Transiluminator UVP, Inc.) donde se extrajo de manera cuidadosa, el fragmento del gel que expresa el exón de interés, el cual se colocó en un microtubo de 1.5 mL.

Por otra parte, se utilizaron membranas de diálisis contenidas en una solución al 50% de etanol, las cuales se sumergieron primero en 30 mL de ddH₂O un minuto y luego en una solución de TBE 0.5X. Posteriormente, los fragmentos del gel correspondiente a cada exón se colocaron dentro de las membranas de elución y se llenaron con solución TBE 0.5X. Las membranas se colocaron dentro de una cámara para electroforesis de forma perpendicular a la dirección del campo eléctrico, a 100 V durante 15 min. Luego, se invirtió la dirección del campo durante 15 s y las muestras resultantes se extrajeron de la membrana, donde se colocaron en un filtro (*Centrifugal filters, Amicon Ultra-4*) previamente humedecido con 1 mL de ddH₂O. Finalmente, los filtros se centrifugaron a 1500 xg durante 15 min. El sobrenadante se transfirió en tubos de 0.5 mL donde se mantuvieron a 4°C.

6.6 Secuenciación

Para realizar el proceso de secuenciación, se efectuaron reacciones de PCR con la adición de los siguientes reactivos: 5 μ L ddH₂O, 1 μ L *BigDye Solution 5X*, 2 μ L *BigDye Terminator reaction Mix*, 1 μ L de oligonucleótido 5' oligonucleótido 3' y 1 μ L de DNA purificado de pacientes y controles. Las condiciones de secuenciación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 96°C durante 1 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 10 s, con un proceso de alineamiento a 50°C por 5 s y extensión a 60°C por 4 min. Finalmente, 1 ciclo de extensión final a 4°C como se muestra en la **tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones de PCR para secuenciación

No. ciclos	T ₁	T ₂	T ₃
1	96°C/1 min		
35	96°C/10 s	50°C/5 s	60°C/4 min
1			4°C

Al finalizar la reacción de PCR, las muestras se purificaron con *BigDye XTerminator*, en donde se les colocaron a cada una 45 μ L de *SAM solution* y 10 μ L de *BigDye XTerminator*. A continuación, las muestras se sometieron a un proceso de agitación con vórtex durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm durante 2 min en una Microcentrifuga Eppendorf, donde el sobrenadante se transfirió a tubos limpios para secuenciación y se les colocó una septa. Cada tubo se distribuyó a lo largo de la bandeja del autosampler, cuidando la posición de cada muestra. El equipo de secuenciación 310, *Genetic Analyzer ABI PRISM™ Applied Biosystems* se acondicionó previamente para que se ingresara el autosampler con las muestras. Una vez terminada la reacción de secuenciación, se analizaron los datos obtenidos a través del software Chromas Lite 2.6.

7. RESULTADOS

7.1 Cuantificación de gDNA

Las muestras de gDNA obtenidas de pacientes y controles mostraron una concentración promedio de 350 ng/ μ L y una relación A_{260}/A_{280} de pureza entre 1.8 a 2. Estas condiciones fueron las óptimas para iniciar los análisis moleculares y genéticos.

7.2 Amplificación del gen *NR3C4* mediante PCR

La detección de las variantes genéticas inició mediante la amplificación de la región codificante del gen *NR3C4*. Cada exón se encuentra representado por una letra, donde la letra A corresponde al primer exón y así sucesivamente hasta el exón 8 designado por la letra H.

El proceso para la estandarización de las condiciones de amplificación de cada secuencia nucleotídica se muestra en la **figura 8**, donde el gradiente de temperatura en la fase de alineamiento determinó que el producto de amplificación es específico y de un tamaño esperado respecto al marcador de peso molecular (MPM) a una temperatura de 61°C y una concentración inicial de 1.5 mM de $MgCl_2$ para la primera fracción del exón A utilizando los oligonucleótidos descritos en el **anexo 1**.

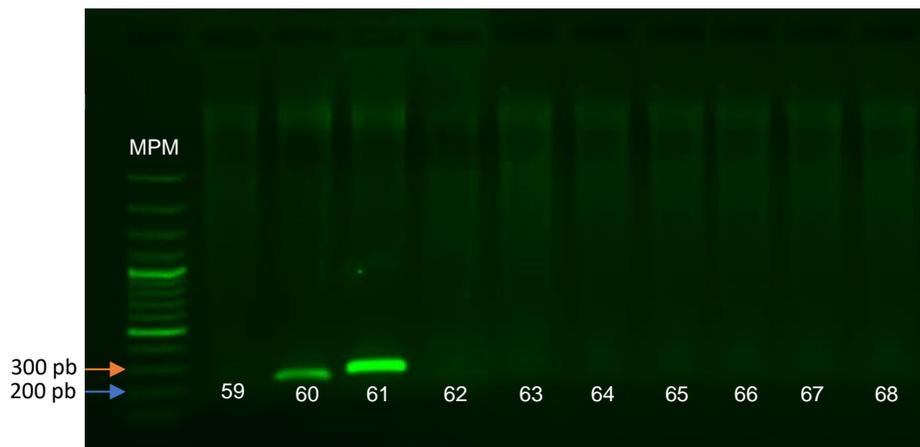


Figura 8. Imagen representativa de los productos de amplificación del fragmento A₁ del gen *NR3C4* obtenidos por PCR en geles de agarosa al 1.0%. La concentración inicial de $MgCl_2$ se mantuvo a 1.5 mM para todas las muestras y la temperatura de hibridación oscila entre 59°C a 68°C respectivamente. El producto amplificado se observa específicamente a 60 y 61°C, siendo esta última la temperatura óptima para la fracción A₁. Este procedimiento se realizó para todos los exones. MPM indica un marcador de peso molecular para DNA de 100 pares de bases. Las flechas indican 200 y 300 pares de bases.

Para los fragmentos restantes del exón A al H, se efectuó el mismo procedimiento trabajando con un gradiente de temperatura (ΔT) en la fase de alineamiento de 57–68°C, y con una concentración inicial de 1.5 mM de MgCl₂. Sin embargo, no se obtuvieron productos amplificados, exceptuando el exón G.

De acuerdo con los resultados previos, la concentración de MgCl₂ se modificó a 2.0 y 2.5 mM y se trabajó con el mismo gradiente de temperatura en la fase de hibridación para obtener los exones restantes. En la **figura 9** se muestran los productos amplificados y de tamaño esperado para cada uno de los exones mencionados. Las condiciones de amplificación se detallan en la **tabla 3**.

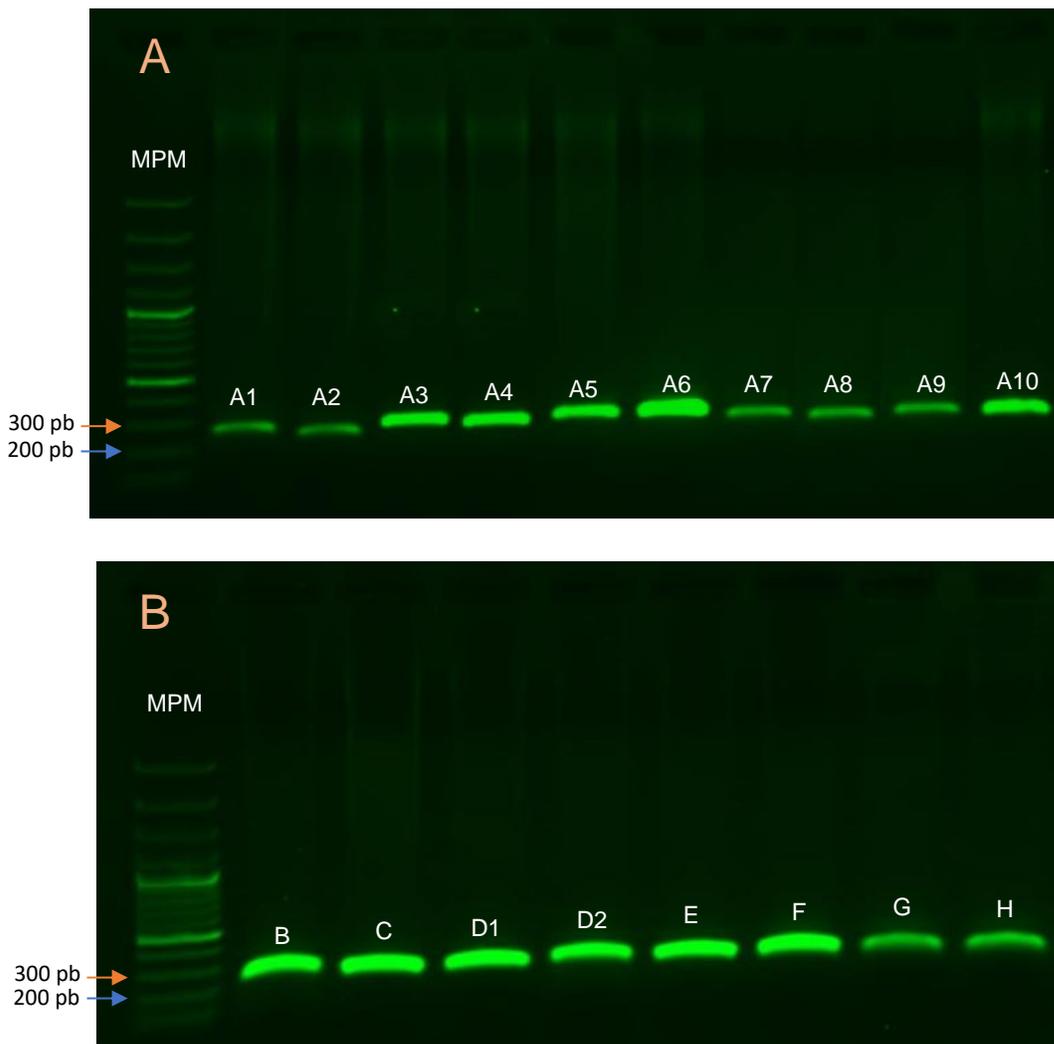


Figura 9. Visualización de los productos obtenidos por PCR del gen *NR3C4* de acuerdo con la concentración de MgCl₂ (mM) y la T_m (°C) óptima para cada exón en geles de agarosa al 1.0%. **A.** El exón A se dividió en 10 fragmentos de tamaño similar. **B.** Los productos restantes amplifican a un tamaño esperado. MPM indica un marcador de peso molecular para DNA de 100 pares de bases. Las flechas indican 200 y 300 pares de bases.

Tabla 3. Condiciones óptimas de amplificación por PCR de los exones A al H del gen *NR3C4*.

Exón	MgCl ₂ (mM)	Tm (°C)
A ₁	1.5	61
A ₂	2.0	61
A ₃	2.0	63
A ₄	2.0	65
A ₅	2.0	63
A ₆	2.0	67
A ₇	2.0	61
A ₈	2.5	61
A ₉	2.0	61
A ₁₀	2.0	57
B	2.5	57
C	2.0	57
D ₁	2.5	57
D ₂	2.5	61
E	2.5	61
F	2.5	57
G	1.5	63
H	2.5	61

Posteriormente, las muestras de pacientes y controles se amplificaron utilizando los datos anteriores, y se sometieron a un proceso de separación electroforética a través de ensayos SSCP.

Para el paciente 1 se realizaron un total de 72 geles de poliacrilamida. La **figura 10A** es una imagen representativa de los resultados obtenidos en los ensayos SSCP para aquellos exones donde no se observa un cambio en el patrón de migración electroforético. Sin embargo, en la **figura 10B** se detectó una alteración en el patrón de bandeo respecto a los individuos control en el exón G del sistema de concentración 5.4% de poliacrilamida con glicerol.

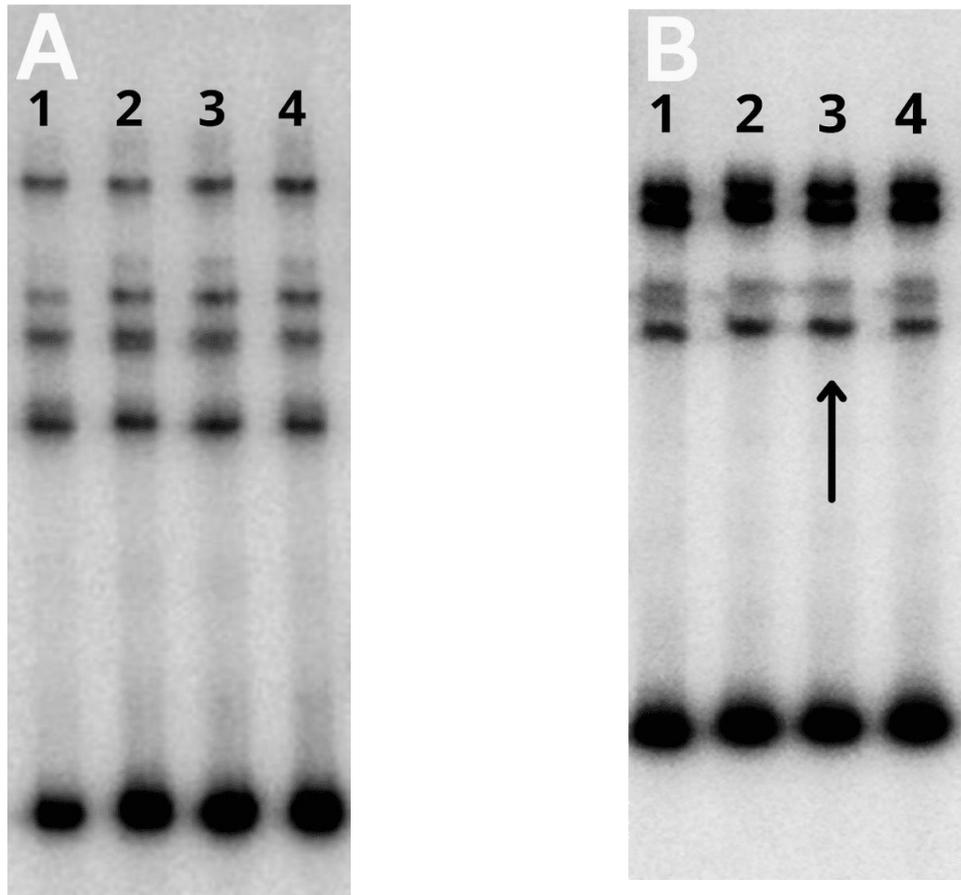


Figura 10. Ensayo SSCP del gen *NR3C4* al 5.4% de poliacrilamida con glicerol en el paciente 1. **A.** Imagen representativa para aquellos exones sin variación en el patrón de bandeo respecto a individuos control. **B.** Detección de variantes en el exón G. Los carriles 1 y 4 representan a individuos control, el carril 3 es la muestra del paciente y el carril 2 es el individuo 11 indicado en el árbol genealógico del paciente.

Para el análisis del paciente 2, se realizaron un total de 72 geles de poliacrilamida. La **figura 11A** es una imagen representativa de los resultados obtenidos en los ensayos SSCP para aquellos exones donde el patrón de migración electroforético es semejante al bandeo de los individuos control. En la **figura 11B** se detectó un cambio en el bandeo electroforético del exón C del paciente en el sistema de concentración 5.4% de poliacrilamida con glicerol.

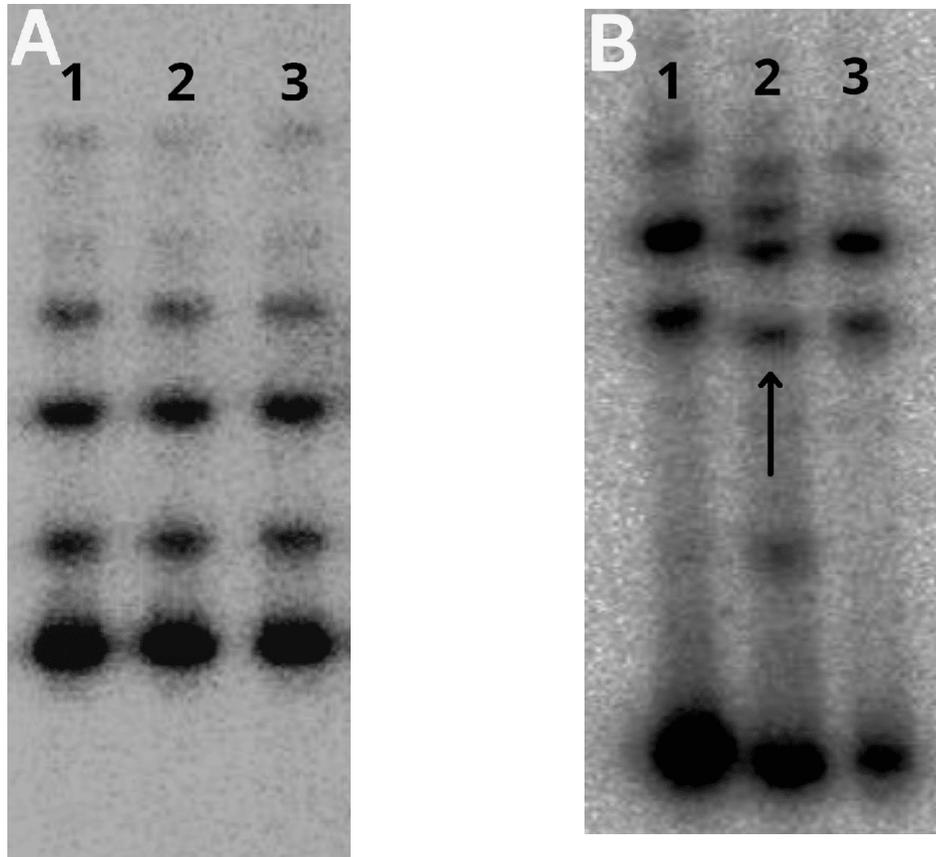
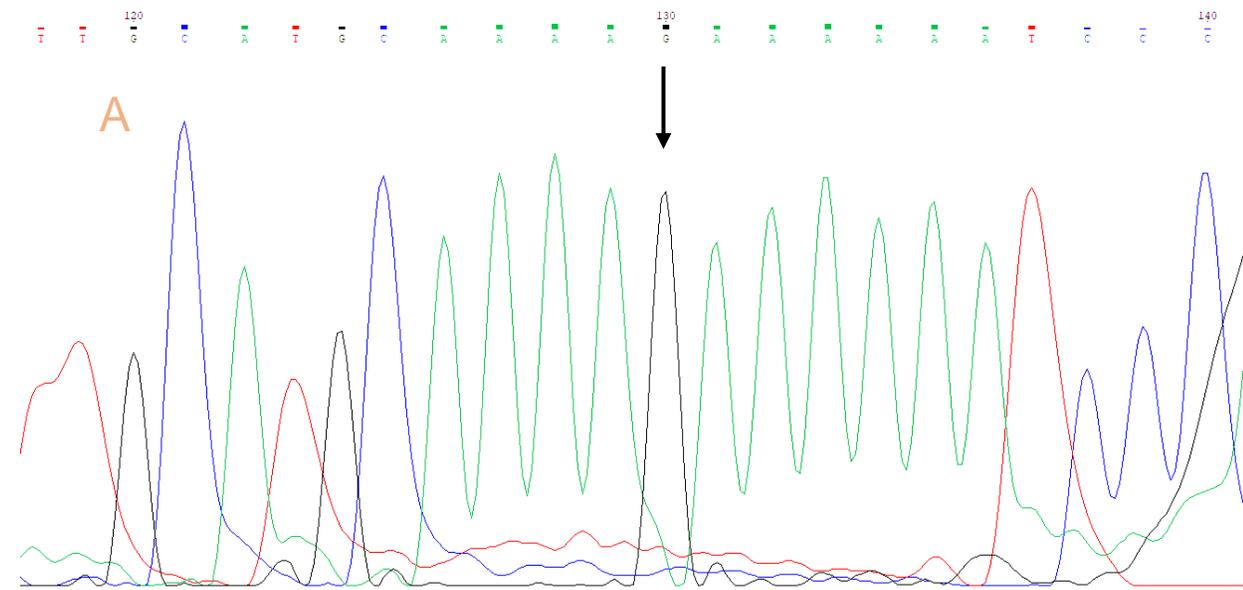
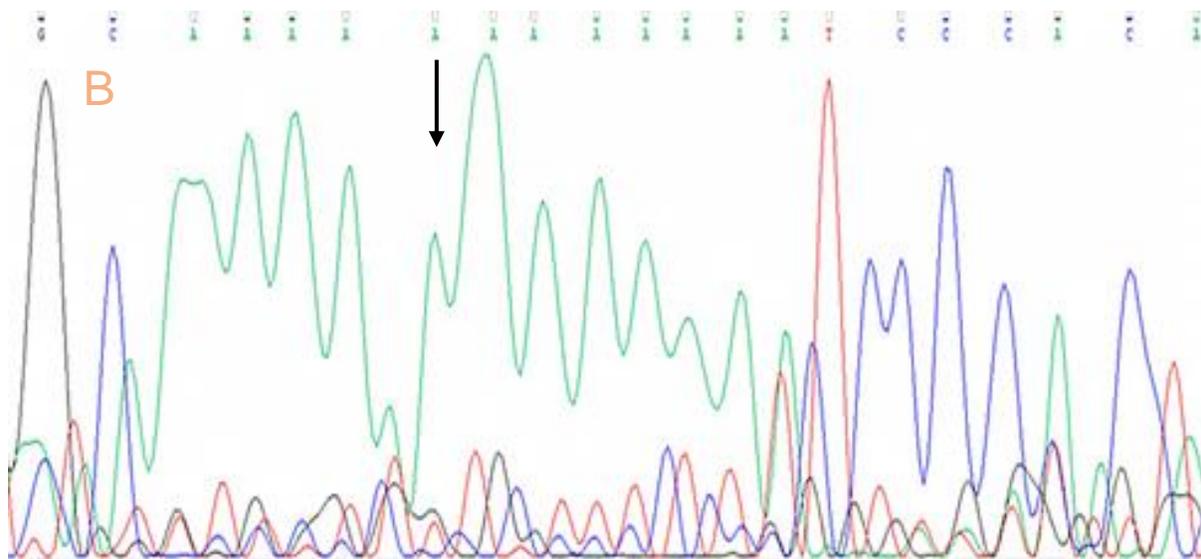


Figura 11. Ensayo SSCP del gen *NR3C4* al 5.4% de poliacrilamida con glicerol en el paciente 2. **A.** Imagen representativa para aquellos exones sin variación en el patrón de bandeo respecto a individuos control. **B.** Detección de variantes en el exón G. Los carriles 1 y 3 representan a individuos control, y el carril 2 es la muestra del paciente.

Una vez obtenidos los resultados anteriores, los productos amplificados correspondientes al exón G en el paciente 1 y al exón C del paciente 2 se secuenciaron. El electroferograma resultante del exón G obtenido del paciente 1, se muestra en la **figura 12** donde se detectó una sustitución de una guanina (G) por una adenina (A) en la segunda posición del codón AGA ubicada en la posición NM_000044.6: c.2540G>A, lo que resultó en un cambio en el cambio del aminoácido arginina (R) por lisina (K) en la posición 847 de la proteína AR. Mientras que el electroferograma obtenido del paciente 2 en el exón C, se muestra en la **figura 13** donde se detectó una delección de un solo nucleótido en la posición p.Asn600Metfs*625 del AR lo que resultó en un desplazamiento en el marco de lectura.



Control 5' TGC AAA AGA AAA AAT CCC ACA TCC 3'
 Aminoácido C K R K N P T S



Paciente 1 5' TGC AAA AAA AAA AAT CCC ACA TCC 3'
 Aminoácido C K K K N P T S

Figura 12. Electroferograma que muestra la secuencia parcial del exón G del gen *NR3C4*. **A.** Se indica el fragmento de la secuencia nucleotídica del individuo control, la cual resalta la base nucleotídica sustituida en el paciente. Además, se incluye la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada codón. **B.** El cambio observado en la secuencia nucleotídica del paciente se encuentra resaltado en rojo.

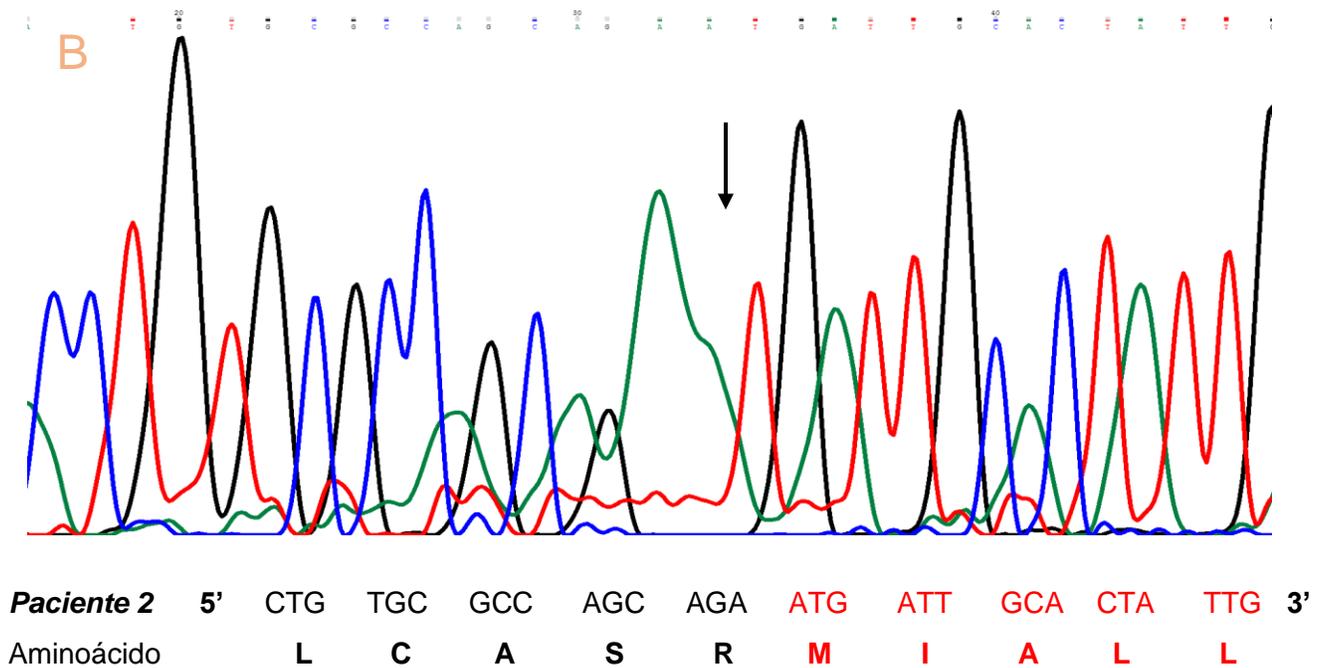
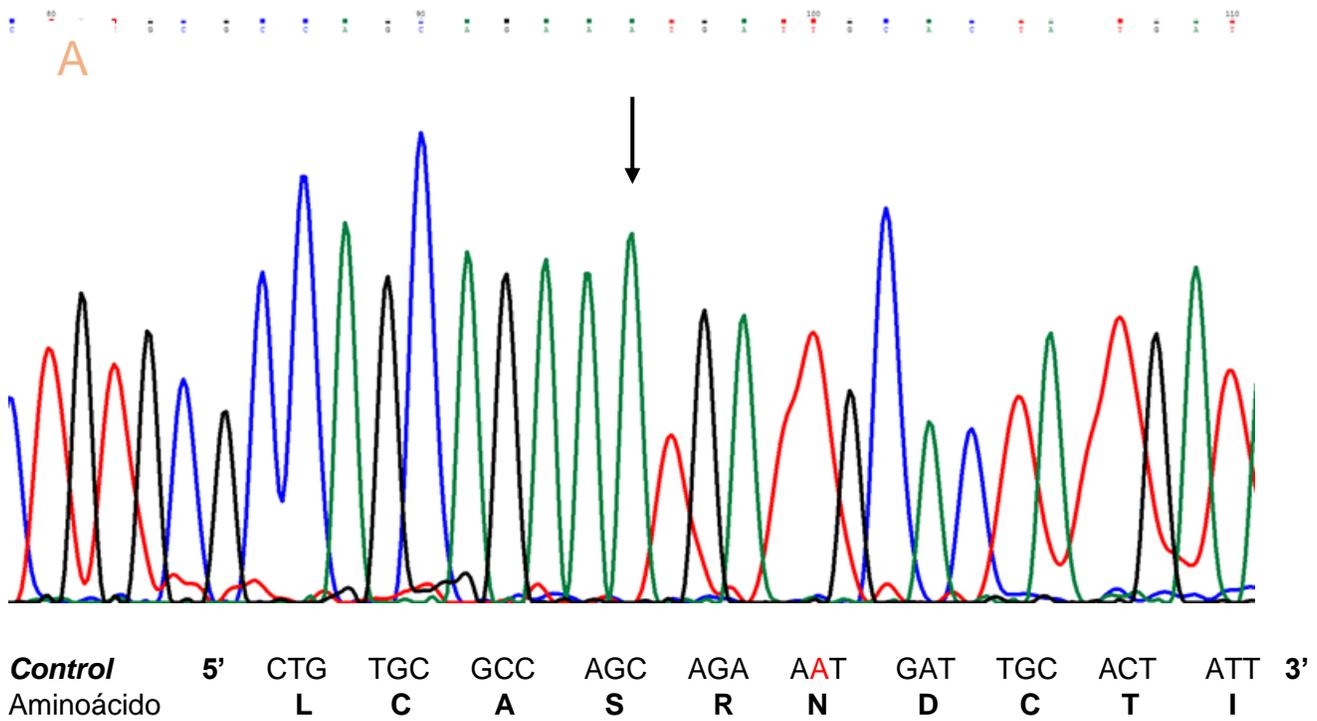
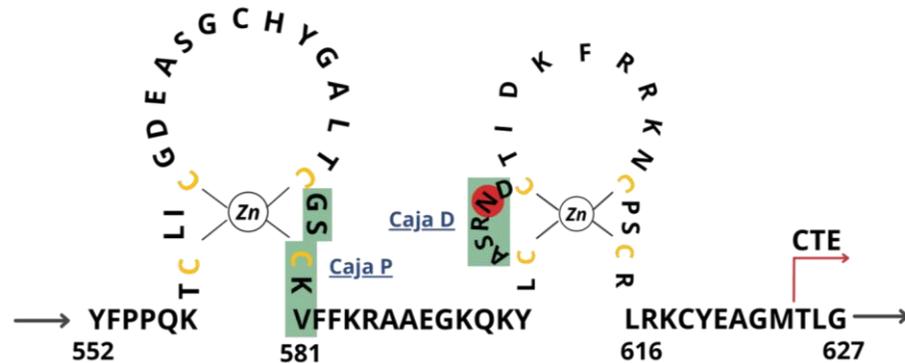


Figura 13. Electroferograma que muestra la secuencia parcial del exón C del gen *NR3C4*. **A.** Se indica la secuencia nucleotídica del individuo control, la base nucleotídica faltante en el paciente está señalada en rojo y está indicada por una flecha. Además, se incluye la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada codón. **B.** El cambio observado en la secuencia nucleotídica del paciente se encuentra resaltado en rojo.

De acuerdo con los resultados anteriores, la variante encontrada en la posición 600 de la proteína del AR conforma la secuencia del segundo dedo de Zn en la región de DBD del receptor, específicamente en la formación de la caja D como se encuentra ilustrado en la **figura 14**.



AR

<i>wild type</i>	YFPPQKCLICGDEASGCHYGALT CGS CKVFFKRAAEGKQKYL CASRND CTIDKFRNRKNCPSCR
<i>paciente 2</i>	YFPPQKCLICGDEASGCHYGALT CGS CKVFFKRAAEGKQKYL CASR MIALLINSE GKIVHLVFG

Figura 14. Estructura de la región AR-DBD. La región DBD se compone de dos motivos, denominados dedos de Zn ricos en cisteína. El primer dedo de Zn está involucrado el reconocimiento al DNA mediante la caja P, mientras que el segundo participa en la dimerización del receptor a través de la caja D, donde se muestra en rojo la posición del aminoácido que se encuentra alterado en el paciente. El resultado de la delección de la base nucleotídica correspondiente da como resultado el corrimiento en el marco de lectura, lo que ocasiona la traducción errónea de aminoácidos en la secuencia resultante del paciente 2, resaltada en rojo.

8. DISCUSIÓN

Los DSD 46,XY son un grupo de patologías congénitas donde el individuo presenta un cariotipo 46,XY y una inconsistencia sexual, gonadal o fenotípica. Dentro de estos desórdenes, el SIA es el más común y su diagnóstico ha sido confirmado por la presencia de variantes en el gen *NR3C4*. Actualmente, se han reportado más de 1000 variantes genéticas encontradas a lo largo del AR/*NR3C4* asociados con SIA y adicionalmente a cáncer de próstata; dentro de las cuales, solo el 60% de estas se relacionan con un diagnóstico para el SIA, localizadas mayoritariamente en las regiones LBD y DBD de la proteína (Tan H, et al. 2015, Hou, L., et al. 2021). Cerca del 30% de las variantes que causan dicho desorden son *de novo*, siendo las más comunes aquellas donde ocurren cambios en el marco de lectura, variantes en el sitio de empalme y sin sentido. Por lo tanto, la presencia de diferentes tipos de alteraciones encontradas a lo largo del AR, pueden ser la causa de los diferentes grados del SIA (Känsäkoski, J., et al. 2016, Ramadevi, R., 2017). Sin embargo, en más del 85% de los casos, el diagnóstico clínico de resistencia androgénica parcial es más difícil y, además, menos del 30% de los casos con sospecha clínica de PAIS están asociados a una variante en el AR/*NR3C4* (Ramos, L., et al. 2018). De acuerdo con lo anterior, es de importancia conocer la presencia de variantes en el gen *NR3C4* en pacientes con un diagnóstico inicial de SIA como primer escenario, utilizando individuos control que permitan evaluar e identificar que la causa inicial de la enfermedad es producto de un cambio en la secuencia nucleotídica del AR. Además, la aportación que brindan los individuos control enriquece y amplía posibles causas de SIA, brindando factibilidad a la investigación de la enfermedad y de esa manera poder realizar un procedimiento validado por la institución. Asimismo, ofrece obtener resultados de manera confiable entre los individuos control y los individuos con SIA.

El análisis molecular en todos los exones del gen *NR3C4* por PCR-SSCP representa un método simple, sensible y robusto cuando se busca identificar variantes génicas, ya que la presencia de un único cambio de base en una secuencia nucleotídica a evaluar altera la conformación del DNA de cadena simple (ssDNA), provocando un cambio en el patrón de migración electroforético cuando se compara con la ssDNA del mismo fragmento (individuos sanos) amplificado en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (Choi, W., & Jung, G., 2016).

De acuerdo con los resultados presentados en la **figura 12** se encontró una sustitución nucleotídica en la posición NM_000044.6: c.2540G>A ubicada en el exón G del paciente 1 y su consanguíneo (**figura 6**) donde el cambio en la proteína fue identificado como NM_000044.6: p.Arg847Lys. El exón G forma parte de la región LBD, el cual constituye el sitio donde los ligandos endógenos como DHT o T se acoplan, provocando un cambio conformacional en la proteína y con él, la exposición de una región de

unión al coactivador (Davey, R., & Grossmann, M. 2016). Debido a que la mayoría de las variantes genéticas se encuentran dentro de la región LBD siendo estas predominantemente variantes de sustitución de una sola base, se ha identificado que el defecto funcional más común del AR/*NR3C4* se debe a la ruptura del LBP, ocasionando que DHT o T no se unan a esta región; estos escenarios se han determinado en pacientes con SIA completo (Werner, R., et al. 2012).

Actualmente, diversas bases de datos contienen información acerca de variantes genéticas identificadas a lo largo del AR que se asocian a padecimientos como el SIA y cáncer de próstata (Gottlieb, B., et al. 2012). De acuerdo con nuestro conocimiento, a la fecha no se ha reportado esta variante en las bases de datos disponibles, por lo que este hallazgo es un aporte fundamental para conocer y enriquecer la información acerca de las posibles causas de la enfermedad. Sin embargo, en el año 2000 el autor Marcelli y colaboradores identificaron una sustitución en la posición 847 de la proteína del AR/*NR3C4*, donde se reemplazó una adenina por una guanina c.2539A>G, un sitio anterior a la reportada en este trabajo. Los autores identificaron esta variante evaluando a pacientes con cáncer de próstata metastásico, donde a través de análisis de SSCP-PCR de 38 individuos en estadio D1; las variantes identificadas, incluyendo la reportada en la posición 847 en la proteína, probablemente desempeñan un papel activo en la promoción al desarrollo de enfermedad metastásica (Marcelli, M., et al. 2000). Sin embargo, los resultados de este estudio y, por ende, de la variante encontrada no están relacionados con el SIA. Por lo que estos hallazgos sustentan el argumento donde se establece que la presencia de diversos cambios en la secuencia del gen *NR3C4* está asociada a múltiples factores que determinan tanto la heterogeneidad fenotípica en pacientes con SIA como con la progresión del cáncer de próstata (Ledig, S., et al. 2005; Aurilio, G., et al. 2020).

Un fenotipo grave de SIA puede estar relacionado con variantes genéticas en la región LBD, especialmente aquellas encontradas en los residuos de aminoácidos 688–712, 739–784 o 827–870, debido a que comprenden la mayor parte de la región LBP (Hughes I., et al. 2012). En contraste a los hallazgos de Zhu, H. y colaboradores, en el 66.67% de los pacientes evaluados en su estudio se identificaron variantes en regiones que forman el fragmento LBP, presentando fenotipos más severos. Los individuos restantes (33.3%), presentaban un fenotipo parcial de resistencia androgénica, alcanzando una mayor interacción N/C a niveles de T más altas o varias concentraciones de DHT *in vitro* en comparación a los casos más graves (Zhu, H., et al. 2021). Esto último tiene relevancia ya que se ha establecido que la interacción N/C se ve afectada por la presencia de variantes en los residuos que conforman a la región LBD y que podría correlacionarse con la gravedad del fenotipo de SIA (Helsen, C., et al. 2012).

Como se mencionó anteriormente, poco menos del 60 % de individuos diagnosticados con PAIS no presentan alteraciones en la secuencia nucleotídica del gen *NR3C4*, por lo que no existe una correlación clara entre el genotipo y fenotipo en pacientes con esta afección. El mosaicismo somático, la unión y el reclutamiento de correguladores al AR/*NR3C4* (activadores y represores) pueden contribuir también a la variación de los fenotipos diagnosticados con resistencia androgénica (Ledig, S., et al. 2005). En el caso del mecanismo del mosaicismo somático de alelos *NR3C4* mutantes y sujetos sanos se ha establecido que su identificación es consecuencia de alteraciones postcigóticas *de novo* en el AR (Köhler, B., et al. 2005).

Otra explicación de las discrepancias genotipo-fenotipo es la variabilidad de niveles de andrógenos y el tiempo de su producción durante el periodo de organogénesis genital. Boehmer y colaboradores, mostraron que la variación de fenotipos intrafamiliares de SIA puede estar asociada con deficiencias adicionales de la enzima 5 α -reductasa 2; en donde las diferencias en la disponibilidad de DHT en tejidos blanco es fundamental de los diferentes tipos de SIA en pacientes con la misma variante en el gen (Boehmer, A., et al. 2001). Además, otros estudios sugieren que las diferencias individuales en las moléculas correguladoras encargadas de modular la actividad transcripcional del *NR3C4* tienen un impacto en el fenotipo final en el paciente en caso de poseer una variante genética en el receptor (Zenteno, J., et al. 2002).

Debido a que el SIA es una enfermedad de herencia recesiva ligada a X y de acuerdo con los resultados obtenidos del paciente 1 y su consanguíneo, podría suponerse que el desarrollo de la enfermedad se debe a que el individuo 3 descrito en la **figura 6**, porta de una copia con una variación en la secuencia nucleotídica del *NR3C4*, la cual es heredada a ambos individuos estudiados. Esto puede suponerse ya que presentan la misma variante en el exón G. Sin embargo, para complementar esta hipótesis, se requiere del estudio e identificación de variantes genéticas a lo largo del exón G de la madre del paciente en estudio.

De acuerdo con los resultados presentados en la **figura 14**, se encontró una delección de un solo nucleótido en la posición 600 de la proteína del AR/*NR3C4* en el paciente 2, generando un desplazamiento en el marco de lectura y codificando un triplete de paro (TAG) prematuro en la posición 625 (NM_000044.6: p.Asn600Metfs*625). La habilidad para determinar la especificidad de la interacción del AR/*NR3C4* con la secuencia de DNA de genes blanco radica en las secuencias de la caja P y la caja D. Como se ejemplifica en la **figura 14**, la variante identificada forma parte de los 5 principales residuos de aminoácidos que conforman la caja D; región implicada en la dimerización entre los monómeros del receptor y en la especificidad de unión a los ARE. Ya que se ha identificado que la propiedad única del AR/*NR3C4* es resultado de la formación de un par de puentes de hidrógeno

formados entre los residuos de alanina (A596) en la posición 596 y una treonina (T602) en la posición 602 (Beato, M., et al. 1995; McEwan, I., 2004, Van Royen, M. et al. 2012).

De acuerdo con Ledig, S. y colaboradores (2005) reportaron la misma delección de una base nucleotídica y una nueva inserción en la región que conforma la caja D, cuya consecuencia es la formación de un codón de paro prematuro en la posición 625 y 621 de la proteína, respectivamente. Ambos hallazgos asocian un fenotipo completo de resistencia androgénica (Ledig, S., et al. 2005). A pesar de que las variantes en el dominio DBD son principalmente cambios de un solo nucleótido, actualmente solo se ha reportado un único caso de delección nucleotídica en la fracción que conforma la caja D, lo que dan como posible resultado defectos en la actividad de unión y dimerización del DNA y la proteína, así como una actividad transcripcional alterada o ausente del AR/NR3C4, lo que resulta en un diagnóstico para CAIS o PAIS según sea la actividad funcional del receptor. Aunque se ha informado que las variantes genéticas causantes por la presencia de codones de término prematuro en la proteína se asocian al diagnóstico del fenotipo CAIS (Ledig, S., et al. 2005, Gottlieb, B., et al. 2012, Chen, F., et al. 2020).

Hasta la fecha, son pocos los estudios realizados sobre la funcionalidad para evaluar la capacidad de unión del AR/NR3C4 a promotores en genes blanco en delecciones de un único nucleótido en el exón C. Múltiples estudios resaltan la importancia de la integridad de la región de extensión C-terminal (CTE, aminoácidos 625–636), puesto que proporciona una interfaz adicional en el DBD del dímero, actuando en conjunto con los aminoácidos que forman al segundo dedo de Zn para ejercer unión específica y de alta afinidad a los ARE (Schoenmakers, E., et al. 2000, Haelens, A., et al. 2001). A pesar de que la región DBD de la familia de los receptores nucleares es una región altamente conservada, la homología de secuencia se reduce dentro de la CTE, lo que da como resultado residuos únicos que pueden potenciar la especificidad de unión entre la región ARE y el AR/NR3C4. Diversos análisis cristalográficos de la región DBD de los receptores de estrógeno (ER-DBD) y de los receptores para glucocorticoides (GR-DBD) indican que la CTE no está involucrada en la unión de estos receptores al DNA, lo que conduce a la especificidad única del AR/NR3C4 (Centenera, M., et al. 2008, Van Royen, M. et al. 2012).

De acuerdo con los aspectos clínicos proporcionados del paciente 2 y el diagnóstico inicial del fenotipo CAIS en la vida adulta temprana, el desarrollo mamario completo (Tanner V) y la presencia de amenorrea primaria sugiere que la falta de la acción androgénica y la producción normal de AMH por parte de las células de Sertoli en los testículos, es el principal impulsor del desarrollo mamario y la ausencia de genitales internos femeninos (útero, el cuello uterino y la parte proximal de la vagina) respectivamente. Por lo que la presencia de características sexuales secundarias femeninas

dependiente de estrógenos, ocurre como resultado del exceso de aromatización de los andrógenos por parte de la enzima aromatasa. Un mal funcionamiento en el AR tiene como consecuencia un perfil endócrino de un estado resistente a las hormonas (Boehmer, A., et al. 2001; Hughes, I., et al. 2012).

Debido a que el SIA es una enfermedad de carácter hereditario recesivo ligado a X, se evaluó la presencia de variantes genéticas a lo largo del gen *NR3C4* en familiares del paciente como se muestra en la imagen de la **figura 7**. Sin embargo, no se encontraron alteraciones en la secuencia nucleotídica de ningún miembro, lo que puede suponer que se trate de una variación genética *de novo*, es decir, se pudo haber originado durante las primeras etapas de la embriogénesis y muy probablemente es producto de un cambio en la secuencia nucleotídica del exón en la etapa postcigótica, donde solo algunas células somáticas presentan dicha variante. Si bien la importancia de todas las variantes conocidas en DBD no se ha dilucidado por completo, es probable que las variantes genéticas en esta región del AR/*NR3C4* interfieran con la unión al DNA, la exportación nuclear y el reclutamiento de moléculas correguladoras, lo que afectaría la transactivación del receptor (Köhler, B., et al. 2005; Chen, F., et al. 2020).

Por ello, la presencia de las variantes genéticas encontradas en este estudio en el gen *NR3C4* de ambos pacientes, representa una aportación importante en la correlación entre el fenotipo observado y el SIA. Sin embargo, es de relevancia complementar estas hipótesis con estudios de funcionalidad del receptor, evaluando la actividad del AR de los pacientes y la funcionalidad de este en individuos sanos, bajo las condiciones experimentales igualitarias.

9. CONCLUSIONES

Con el diseño *in silico* de oligonucleótidos y reacciones de PCR, se obtuvieron productos específicos y de tamaño esperado para cada exón del gen *NR3C4*.

El paciente 1 y su consanguíneo presentaron una sustitución nucleotídica en la posición NM_000044.6: c.2540G>A en el exón G, lo que podría asociarse a la causa de resistencia androgénica parcial característica en ambos individuos, siguiendo un patrón de herencia recesivo ligado a X. Aunque la variante no ha sido reportada anteriormente para SIA, este cambio podría afectar la conformación de la región LBP, ocasionando la inactivación del AR/NR3C4.

El paciente 2 presentó una variante génica por desplazamiento de marco de lectura en la posición NM_000044.6: p.Asn600Metfs*625 en el exón C, lo que se asocia a la causa de resistencia androgénica completa característica del individuo de acuerdo con lo reportado en la literatura. La variante presente probablemente puede asociarse a una variación génica *de novo*. La presencia de la variante afecta la especificidad y la transactivación del AR/NR3C4.

En ambos casos clínicos se requieren de estudios sobre la funcionalidad del AR/NR3C4 para confirmar y enriquecer la información acerca de la causa del desorden.

10. PERSPECTIVAS

Se sugiere realizar análisis funcional *in silico* de la proteína mutada en diversas plataformas bioinformáticas con el fin de predecir el efecto de los cambios en la secuencia nucleotídica encontrados en cada paciente y su posible implicación en el fenotipo del SIA.

Para complementar los resultados de este estudio, investigaciones experimentales a futuro sugieren la realización de ensayos de funcionalidad del AR/NR3C4 para el par de variantes identificadas en cada paciente analizado con el fin de establecer y enriquecer información asociada al padecimiento del SIA, así como monitorear la actividad de la proteína AR/NR3C4 en respuesta a los ligandos endógenos.

En caso de no identificar la correlación entre las variantes genéticas, la actividad del AR/NR3C4 y el fenotipo presentado en el paciente, se sugiere un análisis adicional para la búsqueda de variantes en genes responsables de codificar para enzimas involucradas en el proceso de biosíntesis de andrógenos.

11. REFERENCIAS

- Adachi, M., et al. (2000). Androgen-Insensitivity Syndrome as a Possible Coactivator Disease. *New England Journal of Medicine*, 343(12), 856–862.
- Ahmed, F., et al. (2015). Disorders of sex development: advances in genetic diagnosis and challenges in management. *Advances in Genomics and Genetics*, 201(5), 165-177.
- Auchus, J. (2004). The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 15(9), 432–438.
- Audi, L., et al. (2010). Novel (60%) and Recurrent (40%) Androgen Receptor Gene Mutations in a Series of 59 Patients with a 46,XY Disorder of Sex Development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(4), 1876–1888.
- Aurilio, G., et al. (2020). Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells*, 9(12), 2653.
- Beato, M., et al. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83(6), 851–858.
- Bizzarri, C., & Cappa, M. (2020). Ontogeny of Hypothalamus-Pituitary Gonadal Axis and Minipuberty: An Ongoing Debate?. *Frontiers in endocrinology*, 11, 187.
- Boehmer, A., et al. (2001). Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *The Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(9), 4151–4160.
- Boehmer, A., et al. (2001). Phenotypic Variation in a Family with Partial Androgen Insensitivity Syndrome Explained by Differences in 5 α Dihydrotestosterone Availability. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(3), 1240–1246.
- Callewaert, L., et al. (2006). Interplay between Two Hormone-Independent Activation Domains in the Androgen Receptor. *Cancer Research*, 66(1), 543–553.
- Centenera, M., et al. (2008). Minireview: The Contribution of Different Androgen Receptor Domains to Receptor Dimerization and Signaling. *Molecular Endocrinology*, 22(11), 2373–2382.

- Chakraborty, S., et al. (2021). Revisiting steroidogenesis and its role in immune regulation with the advanced tools and technologies. *Genes and Immunity*, 22(3), 125–140.
- Chen, F., et al. (2020). Computational analysis of androgen receptor (AR) variants to decipher the relationship between protein stability and related-diseases. *Scientific Reports*, 10(1), 12101.
- Choi, W., & Jung, G. Y. (2016). Highly multiplex and sensitive SNP genotyping method using a three-color fluorescence-labeled ligase detection reaction coupled with conformation-sensitive CE. *Electrophoresis*, 38(3-4), 513–520.
- Cools, M. et al. (2017). Genetic Defects of Female Sexual Differentiation. *Hormones, Brain and Behavior*, 105–134.
- Davey, R., & Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical biochemist*, 37(1), 3–15.
- Dhole, B., & Kumar, A. (2017). Chapter 9 Hypothalamic-Pituitary-Testicular Axis. Ed. 3. In *Basics of Human Andrology*, (pp. 117–134). New Delhi, India.
- Díaz, V., et al. (2017). Consideraciones generales en el establecimiento del sexo en mamíferos. *TIP*, 20(1), 27–39.
- Dong, Y., & Zhu, H. Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis: Basic Principles and Routine Practice. *Hypertension*, 149–158
- Donohoue, P., (2020). Chapter 606 Disorders of Sex Development. Ed. 21. In *Nelson Textbook of Pediatrics* (pp. 3008-3019.e1). Philadelphia, PA: Elsevier.
- Eggers, S., et al. (2014). Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(11), 673–683.
- Eggers, S., & Sinclair, A. (2012). Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Research*, 20(1), 215–238.
- Esteban, E., et al. (2005). Androgen receptor CAG and GGC polymorphisms in Mediterraneans: repeat dynamics and population relationships. *Journal of Human Genetics*, 51(2), 129–136
- Estermann, A., et al. (2020). Gonadal Sex Differentiation: Supporting Versus Steroidogenic Cell Lineage Specification in Mammals and Birds. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 616387.

- Flück C., et al. (2003). The 17, 20-lyase activity of cytochrome P450c17 from human fetal testis favors the Δ^5 steroidogenic pathway. *The Journal Clinical Endocrinology Metabolism*, 88(8), 3762–3768.
- Gelmann, E. P. (2002). Molecular Biology of the Androgen Receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 20(13), 3001–3015.
- Grinspon, P., et al. (2020). Male Hypogonadism and Disorders of Sex Development. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 211.
- Gottlieb, B., et al. (2012). The Androgen Receptor Gene Mutations Database: 2012 Update. *Human Mutation*, 33, 887–894.
- Haelens, A., (2001). Androgen-receptor-specific DNA binding to an element in the first exon of the human secretory component gene. *Biochemical Journal*, 353(3), 611–620
- Hake, L. & O'Connor, C. (2008). Genetic Mechanisms of Sex Determination. *Nature Education*, 1(1), 25.
- He, B., et al. (2000). FXXLF and WXXLF Sequences Mediate the NH₂-terminal Interaction with the Ligand Binding Domain of the Androgen Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), 22986–22994.
- Helsen, C., et al. (2012). Evidence for DNA-binding domain-ligand-binding domain communications in the androgen receptor. *Molecular and cellular biology*, 32(15), 3033–3043.
- Hou, L., et al. (2021). One hundred twelve cases of 46, XY DSD patients after initial gender assignment: a short-term survey of gender role and gender dysphoria. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16, 416.
- Hughes, A., et al. (2007). Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 21(3), 351–365.
- Hughes, I., et al. (2012) Androgen insensitivity syndrome. *Lancet*, 380, 1419–1437.
- Hughes, I., et al. (2012). Androgen insensitivity syndrome. *Seminars Reproductive Medicine*, 30(5), 432-474.
- Hur, E., et al. (2004). Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *PLoS Biology*, 2(9), E274.

- Hutson, M., et al. (2013). The Regulation of Testicular Descent and the Effects of Cryptorchidism. *Endocrine Reviews*, 34(5), 725–752.
- Jääskeläinen, J., (2012). Molecular biology of androgen insensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 352(1-2), 4–12.
- Känsäkoski, J., et al. (2016). Complete androgen insensitivity syndrome caused by a deep intronic pseudoexon-activating mutation in the androgen receptor gene. *Scientific Reports*, 6(1), 32819.
- Köhler, B., et al. (2005). Androgen insensitivity syndrome: somatic mosaicism of the androgen receptor in seven families and consequences for sex assignment and genetic counseling. *The Journal Clinical Endocrinology Metabolism*, 90(1), 106–117.
- Kojima, Y., et al. (2007). Up-regulation of SOX9 in human sex-determining region on the Y chromosome (SRY)-negative XX males. *Clinical Endocrinology*, 68(5), 791–799.
- Kuiri-Hänninen, T., et al. (2014). Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy, minipuberty. *Hormone Research Paediatrics*, 82(2), 73–80.
- Kumagai, J., et al. (2002) INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *The Journal of biological chemistry*, 277(35), 31283–31286.
- Ledig, S., et al. (2005). Novel and Recurrent Mutations in Patients with Androgen Insensitivity Syndromes. *Hormone Research in Paediatrics*, 63(6), 263–269.
- Lee, M. (2017). Testicular Development and Descent. *Fetal and Neonatal Physiology*, 1528–1535. e2.
- Lehman, M., et al. (2010) Minireview: Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 151(8), 3479–3489.
- Mäkelä, J., et al. (2018). Testis Development. *Endocrine Reviews*, 40(4), 857–905.
- Marcelli, M., et al. (2000). Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancer. *Cancer Research*, 60(4), 944–949.
- Mares, L., et al. (2020). Molecular genetic analysis of AKR1C2-4 and HSD17B6 genes in subjects 46,XY with hypospadias. *Journal of Pediatric Urology*, 16(5), 689.e1–689.e12.
- McEwan, I. (2004). Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocrine Related Cancer*, 11(2), 281–293.

- McEwan, I., & Smith, L., (2018). Androgen Receptor. In *Encyclopedia of Reproduction*. (2nd edition, vol. 1, pp. 222–226). doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.64584-1
- Melo, K., et al. (2005). Androgen insensitivity syndrome: clinical, hormonal, and molecular analysis of 33 cases. *Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia*, 49(1), 87-97.
- Milosevic, A., et al. (2021) Testicular steroidogenesis is suppressed during experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *Scientific Reports*, 11, 8996.
- Mongan, N., et al. (2015). Androgen insensitivity syndrome. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 29(4), 569–580.
- Mouritsen, A., et al. (2013). Androgen Receptor CAG Repeat Length Is Associated With Body Fat and Serum SHBG in Boys: A Prospective Cohort Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(3), E605–E609.
- Nef, S., et al. (2019). Characterizing the bipotential mammalian gonad. Sex Determination in Vertebrates. *Current Topics in Developmental Biology*, 134, 167–194.
- Nef, S. & Parada, L., (2000). Hormones in male sexual development. *Genes & Development*, 14(24), 3075–3086.
- Ni, L., et al. (2013). Androgen induces a switch from cytoplasmic retention to nuclear import of the androgen receptor. *Molecular and cellular biology*, 33(24), 4766–4778.
- O'Neill, M., et al. (2019). Developmental Genetics of the Male Reproductive System. *Human Reproductive and Prenatal Genetics*, 3–25.
- Ozanne, D., et al. (2000). Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Molecular Endocrinology*, 14(10), 1618–1626.
- Parker, K. (2002). Steroidogenic Factor 1: an Essential Mediator of Endocrine Development. *Recent Progress in Hormone Research*, 57(1), 19–36.
- Ramos, L., et al. (2018). Mutational analysis of the androgen receptor (*NR3C4*) gene in patients with 46,XY DSD. *Gene*, 641, 86–93.

- Ramos, L., et al. (2020). Mutational analysis of SRD5A2: From gene to functional kinetics in individuals with steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 200, 105691.
- Raudrant D., & Rabe T., (2003). Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs*, 63(5), 463–492
- Rey R. & Grinspon R., (2011). Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Practice Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 25(2), 221–238.
- Shaffer, L., et al. (2004). Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(14), 4758–4763.
- Schiffer, L., et al. (2019). Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 194, 105439.
- Schoenmakers, E., et al. (2000). Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *The Journal Biology Chemistry*, 275(16), 12290-12297.
- Sreenivasan, R. (2019). Genetic Control of Fetal Sex Development. Ed. 2nd. Academic Press. Melbourne, Australia, 454-467.
- Stamatiades, G., & Kaiser, U. (2018). Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Molecular and cellular endocrinology*, 463, 131–141.
- Stévant, I., et al. (2018). Deciphering Cell Lineage Specification during Male Sex Determination with Single-Cell RNA Sequencing. *Cell Reports*, 22(6), 1589–1599.
- Tan, M., et al. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3–23.
- Tyutyusheva, N., et al. (2021). Complete Androgen Insensitivity Syndrome: From Bench to Bed. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1264.
- Van Royen, M. et al. (2012). Stepwise androgen receptor dimerization. *Journal of Cell Science*, 125(8), 1970–1979.

- Vardanyan, R., & Hruby, V. (2016). Steroid Hormones. *Synthesis of Best-Seller Drugs*, 459–493. doi:10.1016/b978-0-12-411492-0.00027-4
- Verrijdt, G., et al. (2000). Change of Specificity Mutations in Androgen-selective Enhancers. *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 12298–12305.
- Vilchis, F., et al., (2003). Extreme androgen resistance in a kindred with a novel insertion/deletion mutation in exon 5 of the androgen receptor gene. *Journal of Human Genetics*, 48(7), 346-351.
- Werner, R., et al. (2012). Androgen Insensitivity Syndrome. *Seminars in Reproductive Medicine*, 30(5), 432–442.
- Wherrett, D., (2015). Approach to the Infant with a Suspected Disorder of Sex Development. *Pediatric Clinics of North America*, 62(4), 983–999.
- Wilhelm, D., et al. (2007). Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiological Reviews*, 87(1), 1–28.
- Wisniewski, B., et al. (2019). Management of 46,XY Differences/Disorders of Sex Development (DSD) Throughout Life. *Endocrine Reviews*, 40(6), 1547-1572.
- Zenteno, J., et al (2002). Phenotypic heterogeneity associated with identical mutations in residue 870 of the androgen receptor. *Hormone research*, 57(3-4), 90–93.
- Zhang, L., et al. (2015). Reprogramming of Sertoli cells to fetal-like Leydig cells by *Wt1* ablation. *PNAS*, 112(13), 4003-4008.
- Zhu, H., et al. (2021). Phenotypic and biochemical characteristics and molecular basis in 36 Chinese patients with androgen receptor variants. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 122.

ANEXO 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de cada exón del gen *NR3C4*. Diseño de oligonucleótidos 5' y 3' para uno de los ocho exones que conforman el gen *NR3C4* a través del uso del programa de diseño PrimerQuest.

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas diseñadas para cada fragmento del exón A del gen *NR3C4*.

Exón	Secuencias nucleotídicas	Pares de bases (pb)	Tamaño
A1	5'- AGGTGGAAGATTCAGCCAAGCTCA -3' 5'- CTGCAGCAGCAGCAAAGTGG -3'	24 20	201
A2	5'- CGTGCGCGAAGTGATCCAGAA -3' 5'- GCTGTGAAGGTTGCTGTTCTCAT -3'	21 24	269
A3	5'- AGCAGGGTGAGGATGGTTCT -3' 5'- TAAGGTCAGCGGAGCAGC -3'	20 18	276
A4	5'- ACCTCCGGACGAGGATGACTCAG -3' 5'- TGGCGTTGTCAGAAATGGTCGAAG -3'	23 24	257
A5	5'- CCCACTTCCTCCAAGGACAATTAC -3' 5'- AGTATCTTCAGTGCTCTTGCCCTGC -3'	24 24	267
A6	5'- TTGGCCGAATGCAAAGGTTCTCTG -3' 5'- CCAGAGCCAGTGGAAAGTTGTAGT -3'	24 24	256
A7	5'- CGTCTACCCTGTCTCTCTACAAGT -3' 5'- TGAGGGTGACCCAGAACCG -3'	24 19	260
A8	5'- TCGCATCAAGCTGGAGAACCC -3' 5'- ACCACCACACGGTCCATACAAC -3'	21 23	202
A9	5'- AAGAAGGCCAGTTGTATGGACCGT -3' 5'- TTGACACAAGTGGGACTGGGATAG -3'	24 24	237
A10	5'- AAGCGACTTCACCGCACCTGAT -3' 5'- AATCTGAGTGTTTCGCGCAGGTA -3'	22 22	235

Tabla 3. Secuencias nucleotídicas diseñadas para los exones B al H del gen *NR3C4*.

Exón	Secuencias nucleotídicas	Pares de bases (pb)	Tamaño
B	5'- CTGCCATTCAGTGACATGTGTTGC -3' 5'- AAGAGAAGTGCATGTGCAAGACCC -3'	24 24	228
C	5'- CCCGAAGAAAGAGACTCTGGAAAC -3' 5'- AGAGAGGAAGGAGGAGGAAGAGAA -3'	24 24	220
D1	5'- TAAATTCAAGTCTCTCTTCCTTCCC -3' 5'- AAAGGAGTCGGGCTGGTTGTTGT -3'	25 23	219
D2	5'- TGAATGTCCTGGAAGCCATTGAGC -3' 5'- GCTGGTCCATAGGAGCGTTCACTAAA -3'	24 26	239
E	5'- TCAGACTTAGCTCAACCCGTCAGT -3' 5'- AGGTCTGGCCAAGCTGCTGTATTT -3'	24 24	261
F	5'- ATCAGAGACATTCCTCTGGGCTT -3' 5'- CATTCCCTGCACTTCTAGGCACTT -3'	24 24	230
G	5'- TAATGCTCCTTCGTGGGCATGCTT -3' 5'- AAGCACCTCCATCGTTTGCTTAC -3'	24 24	238
H	5'- CCACCTCCTTGTC AACCTGTTT -3' 5'- ACAGGCAGAAGACATCTGAAAGGG -3'	23 24	266